

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Alteraciones genómicas en carcinoma epidermoide de ano
localizado: secuenciación del exoma completo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ismael Ghanem Cañete

Directores

**Jaime Feliu Batlle
Juan Ángel Fresno Vara
Pilar García Alfonso**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**ALTERACIONES GENÓMICAS EN CARCINOMA
EPIDERMOIDE DE ANO LOCALIZADO:
SECUENCIACIÓN DEL EXOMA COMPLETO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ismael Ghanem Cañete

Bajo la dirección de los doctores

Jaime Feliu Batlle

Juan Ángel Fresno Vara

Pilar García Alfonso

Madrid, 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. Ismael Ghanem Cañete

con número de DNI/NIE/Pasaporte 50735753F, estudiante en el Programa de Doctorado Investigación en ciencias médico-quirúrgicas, de la Facultad de Medicina ☒ de la Universidad Complutense de Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

ALTERACIONES GENÓMICAS EN CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ANO
LOCALIZADO: SECUENCIACIÓN DEL EXOMA COMPLETO

y dirigida por: Jaime Feliu Batlle, Juan Ángel Fresno Vara y Pilar García Alfonso

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 6 ☐ de julio ☐ de 2019 ☐

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Dedicatoria

*Dedicada a Paula,
a nuestros tres soles, a mi madre y hermanos,
y a mi padre, con quien sigo compartiendo cada día...*

Agradecimientos

A los directores de esta tesis, Jaime Feliu Batlle, Juan Ángel Fresno Vara y Pilar García Alfonso, por su disposición a resolver mis dudas, por su apoyo, por sus consejos y correcciones.

A todos los colaboradores básicos y clínicos que han participado en este trabajo multidisciplinar, demostrando una vez más la necesidad de un entendimiento conjunto en la investigación traslacional.

Al Grupo Español Multidisciplinar en Cáncer Digestivo (GEMCAD), por apoyar la investigación, contribuyendo en la financiación de este trabajo a través de la beca GEMCAD1403-T.

A los pacientes, que muestran su colaboración para continuar avanzando en la investigación.

A todos los amigos que han colaborado de alguna manera, especialmente a Guillermo, cuyos comentarios y consejos han enriquecido el resultado final de esta tesis. A Josep, por sus visitas y su eterna disposición a escuchar. A todos los demás que, aunque no nombre, me han aportado mucho en el camino.

A Sofía, por sus sabias palabras, sus consejos, su paciencia, su tiempo.

A mi madre, que me ha demostrado lo mucho que se puede conseguir a base de esfuerzo. A mis hermanos, con los que he compartido una infancia feliz. A mi padre, él sabe que no hay palabras que puedan expresar todo lo que ha significado y sigue significando en mi vida, mi ejemplo a seguir, mi mejor amigo.

Gracias a los tres soles que me iluminan cada día, capaces de transformar sus sonrisas, abrazos y entusiasmo, en motivación y capacidad de esfuerzo y trabajo. Y gracias a Paula, que ha sido el pilar fundamental en el desarrollo de este trabajo, su comprensión, su apoyo, su paciencia, su cariño, su esfuerzo, su tiempo, su generosidad, han llenado de contenido esta tesis.

ÍNDICE

1 RESUMEN.....	13
1.1 Resumen en castellano.....	13
1.2 Resumen en inglés.....	16
2 INTRODUCCIÓN.....	23
2.1 Epidemiología del carcinoma epidermoide de ano	23
2.2 Anatomía de la región anal	25
2.3 Etiopatogenia del carcinoma epidermoide de ano	27
2.3.1 Infección por el virus del papiloma humano	28
2.3.2 Persistencia de infección por el virus del papiloma humano.....	30
2.3.3 De la persistencia de infección por el VPH a la malignización.....	32
2.3.4 Vacunación del VPH como profilaxis del carcinoma epidermoide de ano	35
2.3.5 Carcinoma epidermoide de ano VPH negativo	37
2.4 Anatomía patológica del carcinoma epidermoide de ano	38
2.5 Factores pronósticos en carcinoma epidermoide de ano localizado...39	
2.5.1 Marcadores clínicos clásicos.....	40
2.5.2 Biomarcadores moleculares en muestra tumoral	46
2.5.3 Biomarcadores moleculares en sangre	50
2.5.4 Biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento quimio-radioterápico	52
2.6 Tratamiento del carcinoma epidermoide de ano	53
2.7 Secuenciación del exoma completo mediante técnicas de secuenciación masiva	54
3 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	63
3.1 Justificación.....	63
3.2 Hipótesis.....	64
3.3 Objetivos	64
3.3.1 Objetivo principal	64
3.3.2 Objetivos secundarios	65
4 MATERIAL Y MÉTODOS	69
4.1 Diseño del estudio.....	69
4.2 Población del estudio	69
4.2.1 Criterios de inclusión de los pacientes	70
4.2.2 Criterios de selección de la muestra tumoral	70

4.3	Variables clínicas y anatomo-patológicas	70
4.4	Secuenciación del exoma	71
4.4.1	Aislamiento del ADN.....	71
4.4.2	Control de calidad del ADN aislado.....	72
4.4.3	Preparación de las muestras y secuenciación del exoma completo	72
4.4.4	Procesamiento de los datos tras la secuenciación.....	73
4.5	Análisis de genotipo de VPH.....	73
4.6	Filtrado y validación de las variantes genéticas de alto impacto.....	74
4.6.1	Filtrado de las variantes genéticas de alto impacto.....	74
4.6.2	Validación de las variantes genéticas de alto impacto	77
4.7	Análisis de los procesos biológicos y de las vías de señalización	77
4.7.1	Procesos biológicos.....	77
4.7.2	Vías de señalización.....	77
4.8	Filtrado de las variantes genéticas frecuentes	77
4.9	Asociación entre variantes genéticas y características clínico-patológicas.	78
4.10	Asociación entre características clínico-patológicas o variantes genéticas y supervivencia.	79
4.11	Definición de términos incluidos en los objetivos del estudio.....	80
5	RESULTADOS.....	83
5.1	Selección de pacientes. Características clínico-patológicas. Factores pronósticos clínicos.....	83
5.2	Variantes genéticas de alto impacto	91
5.3	Procesos biológicos y vías de señalización	96
5.3.1	Procesos biológicos.....	96
5.3.2	Vías de señalización.....	97
5.4	Variantes genéticas asociadas a características clínico-patológicas	101
5.4.1	Genotipo de alto riesgo del virus del papiloma humano.....	101
5.4.2	Infección por virus de la inmunodeficiencia humana.....	103
5.4.3	Estadio según la clasificación TNM.....	103
5.4.4	Afectación ganglionar	104
5.5	Variantes genéticas asociadas a supervivencia libre de enfermedad	104

6	DISCUSIÓN	111
6.1	Planteamiento del estudio	111
6.2	Variantes genéticas de alto impacto	112
6.3	Vías de señalización	121
6.4	Variantes genéticas asociadas a características clínico-patológicas	133
6.4.1	Virus del papiloma humano	133
6.4.2	Estadios TNM. Afectación ganglionar.	135
6.5	Variantes genéticas con valor pronóstico	137
6.6	Limitaciones del estudio	139
6.6.1	Muestra parafinada	139
6.6.2	Ausencia de muestras pareadas tumor-tejido sano	140
6.6.3	Ausencia de validación de las variantes mediante secuenciación Sanger	140
6.6.4	Falta de información sobre el papel patogénico de variantes	141
6.6.5	Análisis restrictivo de variantes de alto impacto	141
6.6.6	Tamaño muestral	141
7	CONCLUSIONES	145
8	BIBLIOGRAFÍA	149
9	ÍNDICE DE TABLAS	171
10	ÍNDICE DE FIGURAS	175
11	ANEXOS	179
12	ABREVIATURAS	195

RESUMEN

1 RESUMEN

1.1 Resumen en castellano

Introducción

El carcinoma epidermoide de ano es una neoplasia poco frecuente con una incidencia creciente a nivel global. Aunque es más frecuente en la mujer, la población de mayor riesgo son los varones que mantienen relaciones sexuales con varones, especialmente en la población infectada por el virus de la inmunodeficiencia humana. En el 85% de los casos la base etiopatogénica se fundamenta en la persistencia de infección por genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano, favorecida por la inmunodepresión y el consumo de tabaco. Las oncoproteínas virales E6 y E7 promueven la degradación de p53 y Rb, respectivamente, en la célula huésped, favoreciendo la transformación a carcinoma infiltrante. Algunos factores clínicos de mal pronóstico son el sexo masculino, la afectación ganglionar, el tamaño mayor a 5 cm, o la presencia de ulceración cutánea. Menos evidencia existe acerca de los factores pronósticos moleculares. El tratamiento de la enfermedad localizada se basa en la administración de radioterapia concurrente con mitomicina y fluoropirimidinas desde la década de los 70. A pesar de esta aproximación terapéutica, uno de cada tres pacientes presentará una recaída, habitualmente local.

La tecnología de secuenciación de nueva generación ha permitido un gran progreso en el conocimiento de la biología molecular del cáncer, con los consecuentes avances en el escenario clínico. Es esencial, por tanto, trasladar esta técnica también al carcinoma epidermoide de ano, con objeto de conocer las alteraciones genómicas y las vías de señalización que regulan la patogénesis

de esta entidad, así como encontrar factores pronósticos, biomarcadores predictivos de respuesta, e incluso abordar la identificación de dianas terapéuticas.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es identificar aquellos genes que presentan variantes de alto impacto en carcinoma epidermoide de ano, evaluados mediante secuenciación del exoma completo de tejido tumoral conservado en parafina. Por otro lado, se pretende determinar las principales vías de señalización alteradas en este tumor, así como aquellos genes con variantes potencialmente asociados a características clínico-patológicas y a supervivencia libre de enfermedad.

Material y métodos

Se ha realizado secuenciación del exoma completo de 46 muestras, *naïve* para tratamiento, de carcinoma epidermoide de ano localizado, correspondientes a 46 pacientes con información clínica disponible. En el análisis de datos se ha planteado una doble aproximación. Por un lado, se ha realizado un análisis restrictivo, mediante VarSeq™ y Alamut con objeto de identificar variantes genéticas de alto impacto. A partir de las variantes encontradas tras este análisis, se han caracterizado las vías de señalización alteradas por PANTHER. Por otro lado, se ha planteado un análisis exploratorio, a partir de las variantes genéticas más frecuentes, de impacto alto o moderado, identificadas mediante *Variant Effect Predictor*, con la intención de caracterizar los diferentes grupos clínico-patológicos e identificar los genes afectados por variantes que pudieran asociarse a un peor pronóstico de la enfermedad.

Resultados

Se identificaron un total de 333 variantes de alto impacto sobre 312 genes. El tipo de alteración más frecuente es la sustitución *nonsense* (61%). Los genes que presentaron variantes de alto impacto recurrentemente fueron *FBXW7* (9%), *ZNF750* (7%), *CLTC* (7%), *NEXN* (7%), *ARHGAP21* (4%), *CNOT7* (4%), *COG1* (4%), *FAT1* (4%), *KIAA0753* (4%), *KMT2C* (4%), *KMT2D* (4%), *NSD1* (4%), *RHBG* (4%), *SRRM3* (4%), *SYNE2* (4%) y *TRAF3IP1* (4%).

Las vías de señalización más frecuentemente alteradas fueron la vía de Wnt, inflamación, angiogénesis, receptores de la colecistoquinina, apoptosis, EGFR, endotelina, integrinas y PDGF.

En el análisis exploratorio de variantes genéticas asociadas a características clínico-patológicas: 1) La presencia de variantes genéticas sobre 15 genes se asoció a tumores sin infección por el virus del papiloma humano: *ZC3H13*, *ATXN2L*, *ATRNL1*, *ASCL1*, *NEB*, *KAT6B*, *RANBP2*, *PHACTR4*, *DMD*, *RYR2*, *C2orf16*, *BIRC6*, *CMYA5*, *PCNT* y *SDK1*. 2) Las variantes sobre *ATM*, *DMD*, *MED1*, *VWF*, *SYNE1*, *CYFIP2*, *PAPPA2*, *VWA3A*, *FTSJ3*, *UTP14A* y *SLFN11* se encontraron más frecuentemente en los estadios III, mientras que las variantes sobre *ARID1A* fueron más frecuentes en los estadios I-II. 3) Las variantes sobre *ATM*, *DMD*, *VWF*, *SYNE1* y *PAPPA2* son más frecuentes en los casos con afectación ganglionar y, *ARID1A*, *PCNXL2* y *SBF1* en los pacientes sin extensión linfática. 4) Aquellos casos con infección por VIH se asociaron a la presencia de variantes genéticas sobre *KRAP* 5.10.

El análisis exploratorio de alteraciones genéticas con valor pronóstico mostró que la presencia de variantes genéticas sobre *BRCA2*, *ZNF750*, *ZC3H13*, *ZNF599* y *FAM208B* se asocia a peor supervivencia libre de enfermedad.

Conclusiones

En esta serie de carcinoma epidermoide de ano, se ha identificado una frecuencia baja de variantes de alto impacto sobre múltiples genes. Entre estas variantes, se ha confirmado la presencia de mutaciones previamente descritas, como *FBXW7*, *KMT2C*, *KMT2D* o *FAT1*, pero también se han identificado genes con variantes no establecidas en esta neoplasia. La mayoría de las múltiples vías de señalización de carcinoma de ano identificadas forman parte de los *hallmarks* del cáncer. Asimismo, se han encontrado genes con variantes potencialmente asociados a diferentes características clínico-patológicas y con valor pronóstico. Es necesaria la validación de estos resultados en series de mayor tamaño muestral.

1.2 Resumen en inglés

Introduction

The anal squamous cell carcinoma is an infrequent neoplasia with an increasing incidence worldwide. Although it is more frequent in women, the higher risk population are men who have sex with men, particularly in HIV-infected population. In 85% of cases, the etiopathogenesis is based on the persistence of high-risk human papilloma virus infection, facilitated by tobacco consumption and immunodepression. The viral oncoproteins E6 and E7 promote the degradation of p53 and Rb respectively in the host cell, inducing the transformation into infiltrative carcinoma. Some poor prognostic clinical factors are male sex, lymph

node involvement, size greater than 5 cm or the presence of cutaneous ulceration. Less evidence exists about molecular prognostic factors. From 1970s, the treatment in the localized disease consists on the administration of radiation concurrently with mitomycin and fluoropyrimidines. In spite of this therapeutic approach, one of every four patients will have a relapse, usually local.

The next generation sequencing technology has allowed a great progress in the cancer molecular biology knowledge, with the consequent advance in the clinical scenario. It is essential, therefore, to transfer also this technology to the anal squamous cell carcinoma, in order to identify the genomic alterations and the signaling pathways that regulate the pathogenesis of this medical entity, as well as to find prognostic factors, predictive biomarkers of response, and even to address the identification of therapeutic targets.

Aims

The main objective of this work is to identify those genes that have high impact variants in anal squamous cell carcinoma, evaluated by whole exome sequencing of tumor tissue preserved in paraffin. On the other hand, it is intended to determine the main pathways altered in this tumor, as well as those genes with variants potentially associated with clinical-pathological characteristics and with disease free survival.

Material and methods

Whole exome sequencing from 46 treatment-naïve samples of localized anal squamous cell carcinoma, corresponding to 46 patients with disposable clinical information, was performed.

In the data analysis, a double approach has been proposed. On the one hand, a restrictive analysis using VarSeq™ and Alamut was completed, in order to identify the high impact genetic variants. From the genes with variants determined in this analysis, the altered pathways were characterized by PANTHER. On the other hand, an exploratory analysis from the most frequent genetic variants, analyzed by Variant Effect Predictor, was performed, in order to characterize the different clinical-pathological groups, and identify the genes affected by variants that could be associated with a worse prognosis of the disease.

Results

A total of 333 high impact variants were identified through 312 genes. The most frequent type of alteration is the nonsense substitution (61%). The genes which recurrently presented high impact variations were *FBXW7* (9%), *ZNF750* (7%), *CLTC* (7%), *NEXN* (7%), *ARHGAP21* (4%), *CNOT7* (4%), *COG1* (4%), *FAT1* (4%), *KIAA0753* (4%), *KMT2C* (4%), *KMT2D* (4%), *NSD1* (4%), *RHBG* (4%), *SRRM3* (4%), *SYNE2* (4%) and *TRAF3IP1* (4%).

The most frequently altered pathways were Wnt, inflammation, angiogenesis, cholecystokinin receptors, apoptosis, EGFR, endothelin, integrins and PDGF pathways.

In the exploratory analysis of genetic variants associated with clinical-pathological features: 1) The presence of genetic variants in 15 genes was associated with tumors without human papilloma virus infection: *ZC3H13*, *ATXN2L*, *ATRNL1*, *ASCL1*, *NEB*, *KAT6B*, *RANBP2*, *PHACTR4*, *DMD*, *RYR2*, *C2orf16*, *BIRC6*, *CMYA5*, *PCNT* and *SDK1*. 2) Variants in *ATM*, *DMD*, *MED1*,

VWF, *SYNE1*, *CYFIP2*, *PAPPA2*, *VWA3A*, *FTSJ3*, *UTP14A* and *SLFN11* were more frequently found in stage III, while the variants in *ARID1A* were more frequent in stage I-II. 3) Variants in *ATM*, *DMD*, *VWF*, *SYNE1* and *PAPPA2* were more frequent in cases with lymph node involvement and, *ARID1A*, *PCNXL2* and *SBF1* in patients without lymph node extension. 4) Those cases with HIV-infection were associated with the presence of genetic variants in *KRAP* 5.10.

The exploratory analysis of genetic alterations with prognostic value showed that the presence of genetic variants in *BRCA2*, *ZNF750*, *ZC3H13*, *ZNF599* and *FAM208B* is associated with worse disease-free survival.

Conclusions

In this series of anal squamous cell carcinoma, a low frequency of high impact variants on multiple genes has been identified. Among these variants, the presence of previously described mutations has been confirmed, as *FBXW7*, *KMT2C*, *KMT2D* or *FAT1*, but also genes with variants previously not established in this neoplasia have been identified. Most of the multiple identified pathways in anal squamous cell carcinoma are part of hallmarks of cancer. Likewise, genes with variants potentially associated with different clinical-pathological characteristics and with prognostic value have been found. It is necessary to validate these results in series of larger sample size.

INTRODUCCIÓN

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Epidemiología del carcinoma epidermoide de ano

El carcinoma de ano es una neoplasia poco frecuente con una incidencia creciente, que comprende el 2,5% de los tumores digestivos en Estados Unidos (1). En el período 1975-2009 la incidencia del carcinoma escamoso de ano se ha duplicado (2) y en los años posteriores, el número de casos continúa incrementándose progresivamente (1). Un estudio reciente, que analiza la epidemiología del carcinoma de ano a nivel global, aunque no incluye países africanos, señala que América, Australia, y Norte y Oeste de Europa presentan la mayor incidencia, mientras que Asia, Europa central, Europa Oriental y España presentan incidencias más bajas (3). Globalmente, existe un incremento en la incidencia de carcinoma escamoso de ano, exceptuando Asia y España, donde se evidencia una estabilización (3) (figura 1).

En España, la incidencia del carcinoma escamoso de ano es inferior a la que presentan otros países de su entorno (0,3 y 0,1 por 100.000 para hombres y mujeres respectivamente en 2006) (3) (figura 1). La tendencia en mortalidad por carcinoma escamoso de ano para el año 2025 permanece estabilizada para las mujeres con un incremento para los varones (4) .

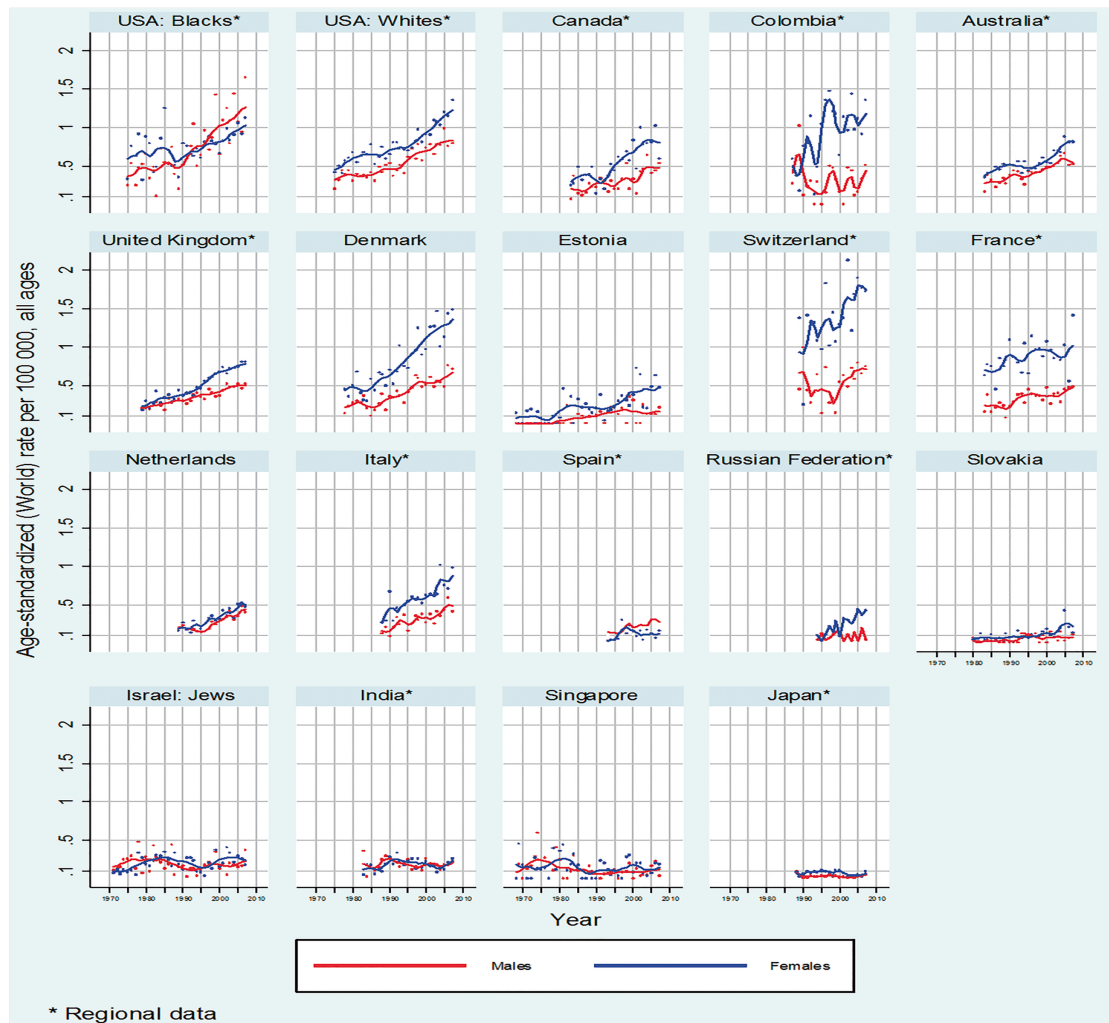


Figura 1. Incidencia ajustada por edad de carcinoma epidermoide de ano, por sexos¹

Los motivos del incremento generalizado en la incidencia del carcinoma escamoso de ano no están claramente definidos, aunque, teniendo en cuenta su estrecha asociación a la infección por el virus del papiloma humano (VPH), podría estar relacionado con un incremento de la prevalencia de infección de VPH en región anal.

¹ Imagen reproducida de Islami F et al, *International trends in anal cancer incidence rates*. *Int J Epidemiol*. 2017 Jun 1;46(3):924–38, con permiso de Oxford University Press.

Otros factores que se asocian al carcinoma epidermoide de ano son el consumo de tabaco (5), la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (6) y otras causas de inmunodepresión. El tratamiento con antiretrovirales para VIH no ha conseguido disminuir el riesgo de desarrollar un carcinoma escamoso de ano, probablemente por haber permitido un incremento en la supervivencia de estos pacientes.

Además, la edad más temprana en la primera relación sexual, así como el mayor número de compañeros sexuales también se asocian con un mayor riesgo de carcinoma escamoso de ano.

La población con mayor riesgo la encontramos en hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres (HSH), especialmente en aquellos infectados por VIH, alcanzando una incidencia de 131 casos por 100.000 (6). No obstante, en la mayoría de los países, el cáncer de ano es más frecuente entre las mujeres (3) (figura 1). En EEUU, por ejemplo, dos de cada tres casos de carcinoma epidermoide de ano ocurren en mujeres (1). En España, no obstante, la incidencia es mayor en hombres (3). El pico de edad de presentación en prácticamente todas las regiones se sitúa entre los 45-64 años.

2.2 Anatomía de la región anal

La región anal es el extremo terminal del tubo digestivo y se divide en canal anal y margen anal.

El canal anal se origina, proximalmente en la zona donde el recto entra en el cabestrillo puborrectal, (palpable como el anillo anorrectal en el tacto rectal), aproximadamente 1-2 cm proximal a la línea dentada y se extiende hasta la unión mucocutánea con la piel perianal, distal a la hendidura interesfinteriana (o línea

blanca de Hilton) y con el límite más externo del esfínter muscular interno (7) (figura 2).

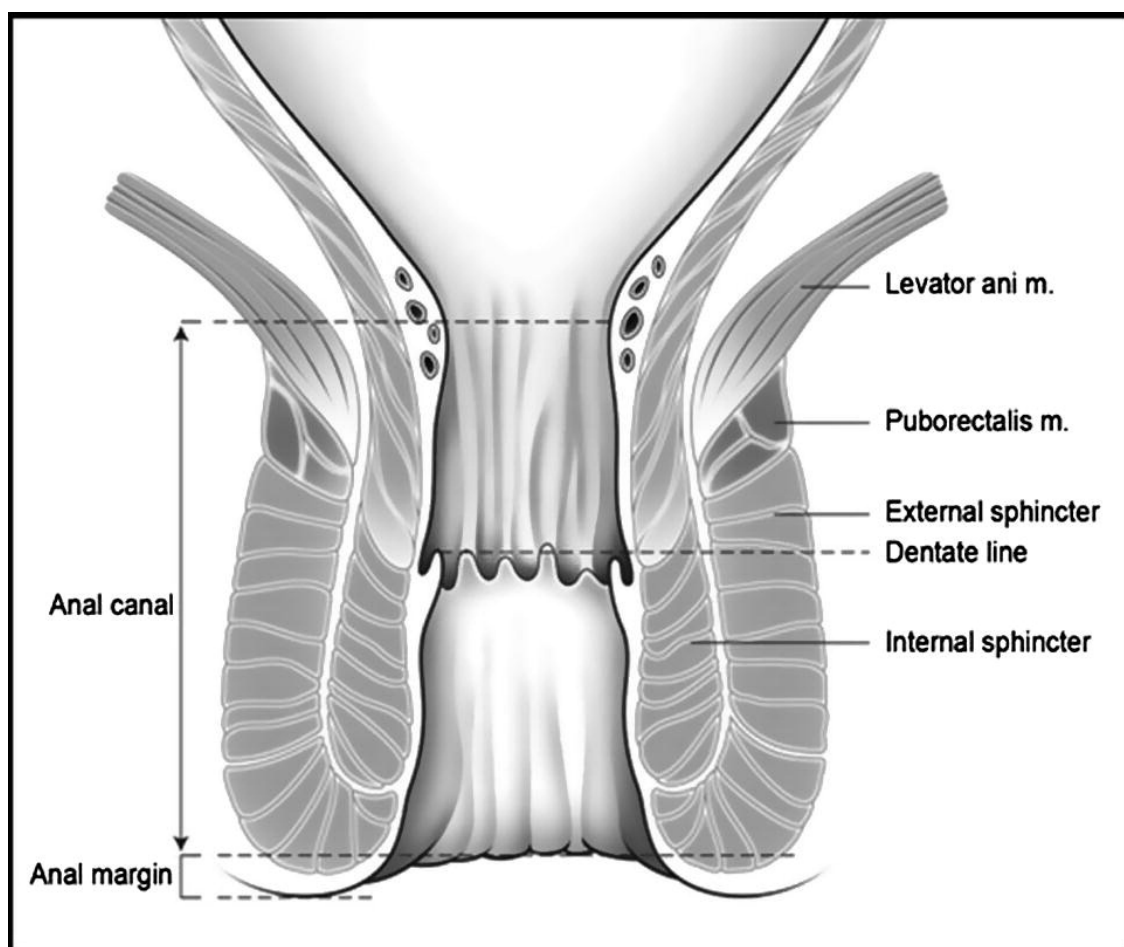


Figura 2. Anatomía de la región anal ²

El canal anal presenta mucosa correspondiente a 3 histologías diferentes: La parte más proximal del ano está tapizada por mucosa colorrectal, la región más proximal a la línea dentada esta revestida por epitelio transicional, mientras que la zona más distal del canal anal está recubierta por un epitelio escamoso no queratinizante, desprovisto de apéndices epidérmicos (folículos pilosos, glándulas apocrinas y glándulas sudoríparas).

² Imagen reproducida de Glynn-Jones R, Nilsson PJ, Aschele C, Goh V, Peiffert D, Cervantes A, et al. *Anal cancer: ESMO-ESSO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2014 Sep;25 Suppl 3:iii10-20. Copyright © (2014), con permiso de Elsevier (8).*

El margen anal o periano se extiende desde la hendidura interesfinteriana hasta la piel perianal. Se encuentra recubierto de epidermis, pero no de mucosa.

2.3 Etiopatogenia del carcinoma epidermoide de ano

La carcinogénesis del carcinoma escamoso de ano es muy similar a la del carcinoma escamoso de cérvix. En ambos casos el pilar básico y evento inicial es habitualmente la infección por VPH, específicamente por genotipos de alto riesgo oncogénico, asociándose habitualmente a otros factores coadyuvantes que impiden el aclaramiento del VPH y favorecen la progresión tumoral. Para entender esta analogía con el cáncer de cérvix hay que tener en cuenta que ambas estructuras comparten las siguientes características embriológicas, anatómicas, histológicas y patológicas: 1. El origen embriológico desde la membrana cloacal embrionaria, presentando epitelio procedente de áreas de fusión de tejido endodérmico y ectodérmico da lugar a un epitelio escamocolumnar; 2. La región más susceptible para la infección por VPH corresponde a este epitelio de transición mucosa glandular-escamoso; 3. El papel patogénico central del VPH en la mayoría de los casos de carcinoma escamoso. En carcinoma de cérvix se considera factor indispensable (9,10), mientras que el 84-88% de los casos de carcinoma de ano presentan infección por VPH (11,12).

Desde que ocurre la infección por VPH hasta el desarrollo de cáncer de ano existen varias etapas que incluyen la persistencia de la infección por VPH, el desarrollo de carcinoma in situ de bajo grado, que evoluciona posteriormente a alto grado y finalmente la transformación a carcinoma infiltrante. La infección por VIH y la inmunodepresión, así como el consumo de tabaco (5) son factores coadyuvantes en la etiopatogenia del carcinoma escamoso de ano.

2.3.1 Infección por el virus del papiloma humano

Los VPH son virus de doble cadena de ADN pertenecientes a la familia *Papillomaviridae* altamente específicos de especie, de forma que el VPH solamente puede infectar a humanos (13). Existen más de 120 genotipos de VPH, de los que aproximadamente 40 pueden infectar el tracto anogenital (13,14)

Las neoplasias asociadas a VPH representan el 3,3% del cáncer en las mujeres y el 2% en varones en EEUU (2). El carcinoma de cérvix es la neoplasia más estudiada, siendo la infección por VPH condición indispensable para su desarrollo (9,10). Además del carcinoma de cérvix y de ano, el VPH también tiene un papel etiopatogénico en otras neoplasias como el carcinoma de orofaringe (15), vulva (16), vagina (17) y pene (18), aunque con una asociación menos marcada (12-70%) (19).

El espectro de subtipos de VPH involucrados en la etiopatogenia del carcinoma escamoso de ano y cérvix es muy similar. El genotipo 16 está presente en la mayoría de los carcinomas de ano (73-80%) (5,12,20) seguido del genotipo 18 en el 3,6% de los casos (12).

El VPH requiere un epitelio estratificado para poder completar el ciclo infeccioso. Inicialmente se produce la infección cuando el virus tiene acceso a una de las células basales a través de un microtrauma, donde existe una replicación reducida con baja expresión viral génica en un intento de evitar la detección y respuesta inmunológica sobre la célula afectada. Posteriormente, en paralelo al proceso de diferenciación de la célula infectada y en las capas más superficiales se produce el ensamblaje y liberación viral (14).

Es importante resaltar que el VPH es responsable de la infección de transmisión sexual más frecuente (21), y que la mayoría de las mujeres y varones sexualmente activos va a contraer al menos una infección por VPH a lo largo de sus vidas (22).

La prevalencia de infección por VPH en región anal es variable en función del sexo y, en el caso de los varones, de la orientación sexual. Globalmente, podemos decir, que la prevalencia en hombres homosexuales es el doble que en mujeres, y en mujeres el triple que en hombres heterosexuales (23). Así, la prevalencia descrita en varones homosexuales varía entre el 57 y el 75% (24,25), en mujeres entre el 27 y el 31% (26,27) y en varones heterosexuales del 11,1% (28). Los escasos estudios que comparan la infección de VPH en ano y cérvix muestran una prevalencia similar en ambas localizaciones (26,27). Al igual que en región cervical, la prevalencia de infección en región anal parece disminuir con la edad (26). En cuanto a la infección por el genotipo 16, un metaanálisis de 2012 concluye que está presente en región anal en el 12,5% de los HSH, y en el 35,4% de los HSH con infección por el VIH (29).

Se ha planteado que la infección por VPH podría tener efecto de campo, es decir, podría migrar de una a otra zona del cuerpo sin necesidad de contacto sexual previo en esa zona (30). Esta característica explicaría en parte la presencia de infección VPH anal en varones heterosexuales, la similar prevalencia en mujeres en región anal y cervical o que la mayoría de las mujeres con cáncer de ano no hubieran presentado previamente relaciones sexuales anales (31). Incluso se ha postulado la transmisión mano-ano (32), aislándose el mismo VPH en dedos y genitales de individuos (33,34). Sin embargo, al menos en cérvix, un estudio

prospectivo muy reciente descarta esta posibilidad, confirmando que la transmisión sexual genital-genital es la más habitual (35).

Los factores de riesgo asociados para infección anal entre los varones son la infección previa a nivel genital, un número elevado de compañeros sexuales y la infección previa por virus de la hepatitis B (36,37).

El motivo de mayor peso para riesgo de infección de VPH en región anal en la mujer es la propia infección a nivel cervical. De hecho, las pacientes con antecedentes de carcinoma infiltrante o *in situ* de cérvix tienen una incidencia mucho mayor de carcinoma escamoso de ano (38,39), mientras que el sexo anal receptivo es un factor de riesgo de menor consistencia en mujeres que en varones (5,39,40). Otros factores de riesgo son el número de compañeros sexuales y la edad menor a 30 años (27,39,41).

Sin embargo, aunque la infección por VPH es una premisa necesaria para el desarrollo de carcinoma epidermoide de ano en la mayoría de los casos, no es suficiente por sí sola.

2.3.2 Persistencia de infección por el virus del papiloma humano

Tras la infección, el siguiente paso necesario en la carcinogénesis del carcinoma epidermoide de ano es la persistencia de la propia infección por VPH. En la mayoría de los casos de infección cervical se produce un aclaramiento de la misma durante los primeros 24 meses (42). Los escasos estudios longitudinales, que analizan la persistencia de infección en región anal también muestran, globalmente, un elevado aclaramiento, a excepción de HSH. Así, sendos estudios muestran que el 87% de las mujeres (43) y el 70,9% de los hombres

que mantienen relaciones sexuales con mujeres (HSM) habían aclarado la infección a los 12 y 6 meses respectivamente, mientras que solamente aclararon el 57,1% de los HSH a los 6 meses (44). Nyitray AG *et al* encontraron infección persistente para cualquier VPH a los 6 meses del 32,1% HSH y 4,2% HSM, mientras que para VPH oncogénicos fue del 16% y 1,6%, y para el VPH16 del 5,1% y 0% para HSH y HSM respectivamente (44). Consecuentemente, parece obvio que el mantener relaciones sexuales anales receptivas favorece, además de la infección por VPH como se ha descrito previamente, la persistencia de la misma (5), incluyendo el genotipo 16 (45), y que la transitoriedad de la infección por VPH y fundamentalmente por VPH-16 en HSM podría ayudar a explicar las extremas diferencias entre la incidencia de cáncer de ano entre HSH y HSM.

En este sentido, factores como la infección por VPH en región cervical (38,39), otras enfermedades ano-genitales relacionadas con VPH y la infección por VIH (6) son factores relacionados con la persistencia de infección de VPH en región anal.

El papel de la respuesta inmune en el control de la replicación del VPH y por tanto en la persistencia de la infección en región anal se pone de manifiesto cuando se analizan los pacientes VIH (+). En este grupo de pacientes se multiplica la prevalencia de infección, manteniendo la estratificación de riesgos en función del sexo y la orientación sexual en los varones. Un estudio que analiza la infección en 251 mujeres VIH (+) y las compara con 68 mujeres VIH (-) mostró una mayor prevalencia de infección (76% vs 42%) y el aislamiento de un mayor número de genotipos de VPH (46). Por otro lado, las pacientes VIH (+) que presentaban un número de linfocitos CD4 inferior a 200 se asociaban a mayor

riesgo de presentar la infección (46). La población VIH (+) masculina también presenta una prevalencia de infección más elevada, particularmente en HSH, que alcanza el 89-95% (29,45,47), y en torno al 60% en HSM (45,47). Uno de estos estudios muestra que los pacientes con menores niveles de linfocitos CD4 presentaban mayores niveles de ADN de VPH oncogénicos (47). El estudio de Patel muestra, además, que el genotipo 16 es el aislado más frecuentemente en la población VIH (+), con una prevalencia para HSH y HSM del 38% y 14% respectivamente y con un aclaramiento a los 48 meses del 51% y 60% (45).

Otras causas de inmunosupresión también favorecen la persistencia de infección por VPH anal, así como el riesgo de desarrollo de carcinoma de ano, probablemente por el mismo mecanismo de acción (48,49)

El consumo de tabaco es un factor de riesgo claramente establecido para el desarrollo de cáncer de ano (5,50). Aunque el papel carcinogénico del tabaco no parece estar asociado a un incremento del riesgo de infección por VPH (41,46) sí se asocia a un retraso en el aclaramiento de la infección del VPH (43).

La persistencia anal del VPH también está influenciada por el propio genotipo, de forma que los VPH de alto riesgo presentan un aclaramiento más rápido (43).

2.3.3 De la persistencia de infección por el VPH a la malignización

Las lesiones anales asociadas al VPH se clasifican en dos grupos junto con el resto de lesiones del tracto anogenital: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL) o lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL). Además, pueden clasificarse en neoplasia intraepitelial (IN) de ano (A) o periano (PA) grado 1, 2 ó 3, de forma que por ejemplo, una neoplasia intraepitelial de ano

grado 1 (AIN 1) corresponde a una LSIL anal, mientras que una AIN 2 o AIN 3 corresponden a una HSIL anal. En aproximadamente el 95% de las HSIL de ano se identifica el VPH (11,12), y en el 75% el genotipo 16 del VPH (51).

El mecanismo por el que la persistencia de infección de VPH lleva al desarrollo de lesiones escamosas de bajo grado, alto grado y posteriormente a la transformación en carcinoma escamoso de ano no está estudiado en profundidad, aunque se puede inferir de los estudios realizados en carcinoma escamoso de cérvix, donde se evidencia la inhibición de genes supresores de tumores y la promoción de inestabilidad genómica (52–55).

La oncoproteína viral E6 promueve la degradación de la proteína p53, provocando un efecto equivalente a la presencia de mutaciones inactivantes de p53 y dificultando, por tanto la apoptosis celular (56–58). Por otro lado, la oncoproteína viral E7 es capaz de formar complejos con pRb, favoreciendo su degradación y por tanto la activación del factor de transcripción E2F y la fase S del ciclo celular (59) (figura 3). La inhibición de las funciones de las proteínas E6 y E7 conlleva la regresión de células VPH transformadas a células con fenotipo normal (60). Consecuentemente, la interacción entre estas oncoproteínas virales y los productos de los genes supresores de tumores p53 y pRb conlleva un elevado grado de inestabilidad genómica con aparición de alteraciones estructurales cromosómicas que favorecen la transformación de CIN a carcinoma. Así, un metaanálisis reciente muestra que, aunque las ganancias en 3q están presentes tanto en lesiones premalignas como en cáncer de cérvix, las pérdidas de 3p y ganancias en 5p son infrecuentes en lesiones precancerosas y más frecuentes en cáncer (61). La ganancia en 3q también parece estar presente

en carcinoma epidermoide de ano VPH (+) (62).

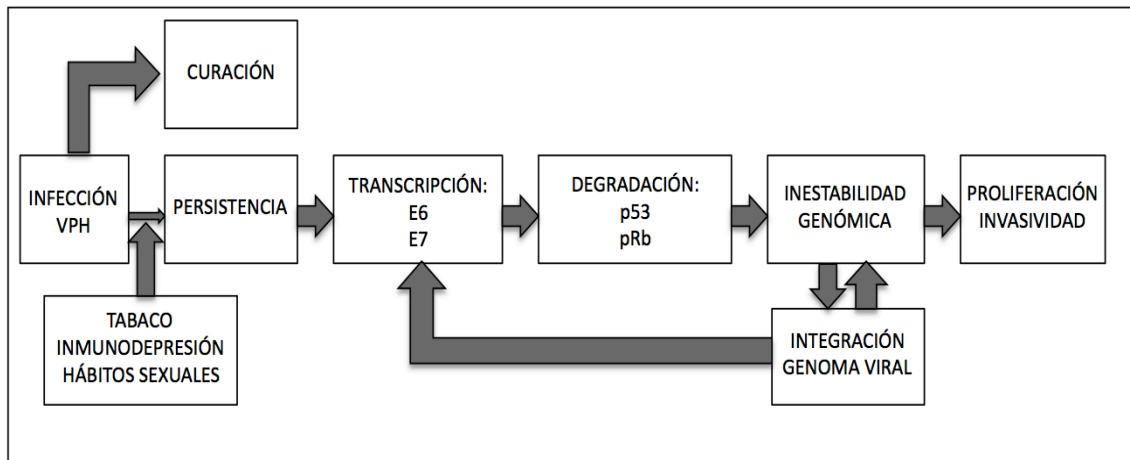


Figura 3. Etiopatogenia del carcinoma epidermoide de ano VPH (+)

Inicialmente, el genoma viral se incorpora a la célula huésped en forma de episoma circular extracromosómico. Sin embargo, a medida que la enfermedad evoluciona desde infección a lesión premaligna y finalmente a cáncer invasivo el genoma viral se encuentra más frecuentemente integrado en el ADN celular (63,64).

Esta integración ocurre más habitualmente en zonas de inestabilidad genómica. Este dato unido a que la inestabilidad cromosómica puede existir en ausencia de integración y que no todos los casos de carcinoma invasivo de cérvix presentan el genoma viral integrado podría sugerir que algún grado de inestabilidad sería necesario para favorecer la integración del genoma viral (64,65). También se ha postulado que el sistema de reparación del ADN juega un papel en este proceso a partir de similitudes entre las secuencias de nucleótidos del VPH y la célula huésped (66). En cualquier caso, la integración del genoma viral favorece el crecimiento celular (67) y la invasividad celular en el carcinoma escamoso del tracto genital femenino (65).

El desarrollo de HSIL también está favorecido por la inmunodepresión en pacientes VIH (+), principalmente en aquellos pacientes con niveles de linfocitos CD4 inferiores a 200 (68,69). A pesar de la elevada prevalencia de infección por VPH oncogénicos en las HSIL, el riesgo de malignización parece relativamente bajo en pacientes inmunocompetentes (70). En la serie de 72 pacientes publicada por Watson *et al.* el 13% de las AIN 2-3 presentaban transformación infiltrante a los 5 años (71). El riesgo de malignización en pacientes inmunocomprometidos es muy superior, alcanzando hasta el 50% en 5 años en series pequeñas (70). Una respuesta linfocitaria deficiente a las oncoproteínas E6 y E7, así como cambios en las células presentadoras de antígeno podrían contribuir al proceso de carcinogénesis en este grupo de pacientes (72). Además, el VPH es capaz de evadir el sistema inmune, fundamentalmente dificultando la adhesión de la célula infectada a la célula presentadora de antígeno y la respuesta de linfocitos T citotóxicos a través de un mecanismo mediado por las oncoproteínas E6 y E7 (73,74)

2.3.4 Vacunación del VPH como profilaxis del carcinoma epidermoide de ano

Sin ninguna duda, la mejor arma para lucha contra el cáncer es su prevención. El carcinoma de ano tiene dos características que permitirían potencialmente su prevención en un elevado porcentaje. Por un lado, la fuerte asociación entre cáncer de ano e infección por VPH, y por otro lado, la existencia de vacunas eficaces contra el VPH.

Un ensayo clínico aleatorizó a 602 hombres sanos HSH de entre 16 y 26 años a recibir la vacuna tetravalente (genotipos 6, 11, 16 y 18) o placebo. En el análisis por intención de tratar se demostró una reducción de la infección persistente anal por estos genotipos un 59,4% y de la incidencia de AIN anual un 50,3% (12,6% vs 6,3%) (75).

La vacunación en mujeres ha mostrado ser altamente eficaz en la prevención del desarrollo de lesiones de alto grado cervicales. El ensayo clínico PATRICIA muestra que a los 4 años tras la administración de la vacuna bivalente (genotipos 16 y 18), la eficacia en cuanto a prevención de CIN3 asociados a VPH 16 o 18 fue del 100%, por lo que parece proteger del carcinoma infiltrante de cérvix (76).

Asimismo, en la vida real empieza a haber datos de la eficacia de la vacuna tras la inclusión en los programas de vacunación. Un metaanálisis sobre registros de países con vacunación superior al 50% de la población diana muestra, respecto al período pre-vacunación, en niñas entre 13 y 19 años, una reducción del 68% en infecciones por los genotipos 16 y 18, y una reducción del 61% de verrugas en región ano-genital. Además, muestra un efecto protector de grupo con reducción de verrugas en niños menores de 20 años y mujeres de 20 a 39 años (77) . Por otro lado, también parece confirmarse un efecto cruzado protector respecto a infecciones por otros VPH de alto riesgo (78).

Sin embargo, aún es pronto para tener datos directos respecto a la reducción del riesgo de cáncer. De hecho, como se ha descrito previamente, la tendencia global es un incremento en la incidencia de cáncer de ano. Hay que tener en cuenta las características de la población de riesgo para el desarrollo de carcinoma epidermoide de ano donde la inmunidad de grupo no incida

(fundamentalmente HSH), por lo que medidas más agresivas como la implantación de la vacunación también en los varones, que ya se está recomendando en algunos países como España, mejorarían los resultados (79).

2.3.5 Carcinoma epidermoide de ano VPH negativo

A medida que las técnicas de detección de VPH mejoran, y se descubren nuevos genotipos, la incidencia de carcinoma escamoso de ano VPH negativo va disminuyendo, de forma que podría plantearse que la infección por VPH fuese un factor necesario en la práctica totalidad de los carcinomas escamosos de ano. No obstante a día de hoy, aproximadamente el 12-16% de los carcinomas epidermoides de ano son negativos para VPH (11,12).

Evidentemente, la baja incidencia de carcinoma epidermoide de ano VPH (-) dificulta el estudio de la carcinogénesis en este subgrupo de tumores, que parece presentar un perfil clínico-patológico diferente, asociado a peor pronóstico (80–82), apoyando la idea de un mecanismo patogénico distinto al carcinoma VPH (+). Un interesante estudio publicado por Meulendijks D muestra que el 80% de los tumores VPH(-)p16(-) presentan mutaciones disruptivas de *TP53*, significativamente mayor que en pacientes VPH(+)p16(+), donde solamente aparece en el 6% de los casos (83). El hecho de que la mayoría de los casos VPH (+) no presenten mutación de *TP53* es compatible con su mecanismo de carcinogénesis, en los que como se ha descrito previamente el déficit de función de la proteína p53 proviene de la degradación de esta, por acción de la oncoproteína E6.

Otras neoplasias VPH (-) de la región anogenital presentan un perfil mutacional de *TP53* similar. En carcinoma escamoso de vulva, el 71% de los casos presenta

mutación *TP53* con peor supervivencia libre de recaída (SLR) (84), mientras que el 76% de los carcinomas de pene VPH (-) se asocian a mutación *TP53*. La elevada proporción de mutaciones de *TP53* en las neoplasias malignas VPH (-) de la región ano-genital apoya la idea de que *TP53* juega un papel clave en su carcinogénesis. (85)

2.4 Anatomía patológica del carcinoma epidermoide de ano

El canal anal sano muestra 3 mucosas diferentes: mucosa glandular, transicional y escamosa no queratinizante. A partir del margen anal (unión muco-cutánea) el periano está recubierto de epidermis.

En el canal anal se pueden originar neoplasias malignas de diferentes extirpes histológicas. De todas ellas, el carcinoma epidermoide de ano es el más frecuente, aunque también existen otras neoplasias más raras como el adenocarcinoma, melanoma, carcinoma de células pequeñas o sarcoma. Sin embargo, habitualmente el término “cáncer anal” se refiere exclusivamente a aquellas neoplasias de ano con histología escamosa.

El carcinoma de células escamosas se origina en la mucosa transicional o en la mucosa escamosa. Los tumores originados en la región más proximal suelen ser no queratinizantes y presentar mayor dediferenciación (86). Los términos basaloide, transicional, cloacogénico o queratinizante identificaban diferentes subtipos de carcinoma escamoso de ano. Sin embargo, teniendo en cuenta la ausencia de diferencias en pronóstico y tratamiento y que las muestras histológicas frecuentemente presentan una mezcla de subtipos celulares, actualmente estos términos están en desuso y se engloba a todos ellos dentro del carcinoma epidermoide (7).

En el margen anal o en la piel perianal la neoplasia maligna más frecuente también es el carcinoma de células escamosas, aunque también existen melanomas o neoplasias no infiltrantes como la enfermedad de Bowen (carcinoma de células escamosas in situ) o la enfermedad de Paget del ano (adenocarcinoma intraepitelial) originaria de una enfermedad primaria cutánea con diferenciación glandular o secundaria a siembra intramucosa/intraepitelial de adenocarcinoma de recto o glándulas perianales.

La diferenciación entre la localización en canal y margen anal resulta difícil en muchas ocasiones. Así, la 8ª edición de la AJCC clasifica las neoplasias de margen anal como aquellas que se originan en la piel o distalmente a la unión escamosa muco-cutánea, que pueden verse en su totalidad con una leve tracción en las nalgas, y que se encuentra dentro de un perímetro cutáneo de 5 cm.

2.5 Factores pronósticos en carcinoma epidermoide de ano localizado

Desde que en la década de los 90 se demostrara el beneficio de la asociación de quimioterapia a la radioterapia en el tratamiento del carcinoma epidermoide de ano localizado, no se ha conseguido ningún avance terapéutico en este escenario (87,88). Con este esquema de tratamiento quimio-radioterápico basado en mitomicina y 5-Fluorouracilo (5-FU) se consigue una supervivencia global a 5 años en torno al 60-75%, con tasas de recaída a los 5 años del 30% y recaídas a distancia en torno al 10% (87–91). La gran mayoría de las recaídas ocurren durante los 2 primeros años de seguimiento. A pesar del claro beneficio de la quimioterapia hay que resaltar que un pequeño grupo de pacientes sufrirá

complicaciones graves potencialmente derivadas de la misma como la toxicidad cardiovascular o segundas neoplasias (92).

Con objeto de realizar una mejor selección de pacientes para la administración de tratamientos agresivos se ha intentado identificar factores pronósticos clínicos y moleculares. Aunque los factores clínicos se han obtenido a partir de grandes estudios prospectivos, la identificación de factores moleculares se ha realizado sobre pequeños estudios retrospectivos.

2.5.1 Marcadores clínicos clásicos

Cinco de los seis ensayos clínicos fase III aleatorizados para el tratamiento del carcinoma epidermoide de ano no metastásico han evaluado el papel pronóstico de diferentes factores clínicos (87–91). La tabla 1 muestra los factores pronósticos clínicos más relevantes evaluados en los ensayos clínicos aleatorizados fase III, que se analizan a continuación.

Estudio	n	Sexo varón	N (+)	T >5cm	Ulceración cutánea	Mayor edad	Disminución Hb basal	Afectación circunferencial
EORTC 22861(87)	110							
Control local		SI	SI	NO	SI	NO	NE	NO
SG		SI	SI	NO	SI	NO	NE	NO
ACT I (93)	292							
Fallo locorregional 2 años		SI	SI	NE	NE	NO	NO	NE
Muerte cáncer ano 5 años		SI	SI	NE	NE	NO	SI	NE
SG 5 años		SI	SI	NE	NE	SI	NO	NE
RTOG 11-98 (94,95)	644							
Tiempo hasta colostomía		NO	NO	SI	NE	NE	NE	NE
SLE 5 años		SI	SI	SI	NE	NE	NE	NE
SG 5 años		SI	SI	SI	NE	NE	NE	NE
ACT II (96)	884							
SLC		SI	NO	SI	NE	NO	SI	NE
SLP		SI	NO	SI	NE	NO	SI	NE
ACCORD03 (+ Fase II KANAL) (97)	387							
SLC		NO	SI	NO*	SI	SI	NO	SI

N: Afectación ganglionar; T: Tamaño tumor primario; Hb: Hemoglobina; NE: No estudiado; * Tamaño >4cm; SG: Superficie global; SLE: Supervivencia libre de enfermedad; SLP: Supervivencia libre de progresión; SLC: Supervivencia libre de colostomía

Tabla 1. Factores pronósticos clínicos negativos según los ensayos clínicos fase III de carcinoma de ano localizado

Sexo

El sexo masculino es uno de los factores clínicos que consistentemente muestra valor pronóstico negativo en carcinoma escamoso de ano localizado. De hecho, todos los ensayos clínicos que lo analizan así como un gran estudio retrospectivo muestran que los varones presentan peor supervivencia (87,93,94,98) con un aumento del cociente de riesgos (HR) de 1,56 y 1,57. Sin embargo, hay datos discordantes respecto a control locorregional: mientras los datos de tres ensayos clínicos sí encuentran mayor riesgo de fallo locorregional, control local o supervivencia libre de colostomía (SLC) (87,93,96), otros dos no evidencian diferencias significativas en el tiempo hasta colostomía o en la SLC (95,97).

Se ha planteado que el hecho de que la mayoría de los pacientes VIH con carcinoma escamoso de ano sean varones pueda ser un factor que explique su peor supervivencia (98). No obstante, los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y VIH fueron excluidos en los ensayos clínicos *Radiation Oncology Therapy Group* (RTOG) 11-98 y *Anal Cancer Trial* (ACT) II respectivamente, estudios que, sin embargo, muestran que el sexo varón es factor pronóstico negativo. Por otro lado, sí estaba permitida la inclusión de pacientes VIH en el estudio ACCORD 03, donde el sexo no muestra relación con la SLC. Sin embargo, la progresiva mejoría en el control de la infección VIH podría haber anulado esta relación en los últimos estudios.

Otros motivos que podrían explicar el peor pronóstico en los varones sería un perfil patogénico diferente al de las mujeres asociado con menor frecuencia a la infección del VPH. Por ejemplo, en el estudio de Soares PC, que analiza una cohorte de pacientes diagnosticados de carcinoma escamoso de ano, las

mujeres presentan significativamente mejor pronóstico, sin embargo también presentan mayor frecuencia de infección por VPH, y en el análisis multivariante el único factor pronóstico es la infección por VPH (99). Asimismo, algunos estudios muestran que los varones podrían presentar con mayor frecuencia tumores p16 (-), que conllevan peor pronóstico (81,100). No obstante, un estudio reciente que recoge datos sobre más de 1.000 pacientes con carcinoma epidermoide de ano encuentra que la infección del VPH tiene un papel pronóstico diferente según el sexo: así, mientras en los varones, la infección se comporta como factor de buen pronóstico, en las mujeres ocurre lo opuesto, rozando la significación estadística. No existe una clara plausibilidad biológica para explicar esta hipótesis (101).

Afectación ganglionar

Al igual que el sexo masculino, los tres ensayos clínicos que han analizado la presencia de afectación ganglionar como factor pronóstico para SG muestran peor pronóstico, con HR de 1,74 y 2,09 (87,93,94). Un estudio retrospectivo realizado sobre 19.199 pacientes del *National Cancer Data Base* respalda el valor pronóstico para supervivencia de la afectación ganglionar (98). En cuanto al control local, existen datos discordantes, tres ensayos clínicos sí encuentran mayor riesgo de fallo locorregional, control local o SLC (87,93,97), mientras que otros dos no evidencian diferencias significativas para tiempo hasta colostomía o SLC (95,96). El hecho de que la definición de SLC incluya, además de casos de recaída local, casos de complicaciones por tratamiento, podría explicar la discordancia entre los diferentes estudios para SLC.

El tratamiento del cáncer de ano mediante quimio-radioterapia no permite la evaluación anatomopatológica tumoral, lo que limita la fiabilidad para la estadificación de este tumor, fundamentalmente a nivel ganglionar. En las últimas décadas, el desarrollo y mejora de técnicas diagnósticas como la resonancia magnética nuclear (RMN) o la tomografía por emisión de positrones (PET) ha llevado a un incremento de los estadios por afectación ganglionar en el diagnóstico, simplemente por una mayor detección de afectación ganglionar no confirmada histológicamente, unida paradójicamente a una mejoría en la supervivencia de los pacientes, que podría estar relacionada con una mejora en los tratamientos. La mejora de las técnicas diagnósticas ha provocado, además de un incremento en la estadificación ganglionar, una pérdida de la capacidad pronóstica de la afectación ganglionar en términos de SG, denominada discriminación pronóstica reducida (102).

Tamaño tumoral

A diferencia del estudio de la *European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy* (EORTC), el estudio RTOG 11-98, sobre un tamaño muestral de pacientes mucho mayor, evidencia que el tamaño > 5 cm es un factor pronóstico tanto para tiempo hasta colostomía (95), como para supervivencia libre de enfermedad (SLE) y SG (94). En este estudio se establecieron 4 grupos pronósticos, a partir de la afectación ganglionar (SI vs NO) y del tamaño tumoral (mayor vs menor o igual a 5 cm), destacando un grupo de especial mal pronóstico correspondiente a aquellos tumores >5cm y N(+), con SLE a 3 años de tan solo el 30% y SG a los 4 años del 48%. Del mismo modo, el análisis de factores pronósticos en el estudio ACT II muestra peor

supervivencia libre de progresión (SLP) y SLC para los pacientes con tamaño tumoral > 5 cm (96). El estudio ACCORD no encuentra diferencias en SLC para tamaño tumoral ≥ 4 cm (97).

Clasificación TNM

La 6ª edición (y la 7ª edición) de la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) para cáncer de ano ha demostrado el valor pronóstico para SG en grandes series de pacientes (98,103). Recientemente se ha evaluado el valor pronóstico de la 8ª edición respecto a las 6ª y 7ª ediciones sobre los datos de casi doce mil pacientes procedentes la base de datos The Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) entre 2004 y 2014 (103). En la nueva edición, la subclasificación de los estadios II en estadios IIA y IIB aporta una ventaja en términos de supervivencia. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las comparaciones IIB vs IIIA; IIIA vs IIIB; IIIB vs IIIC y la mediana de supervivencia en los estadios IIIA fue mayor que en los estadios IIB. Globalmente, la 8ª edición no muestra una mejora en la estatificación de la SG o predicción de supervivencia específica de cáncer (103).

Ulceración cutánea

Solamente dos ensayos clínicos evaluaron el papel pronóstico de la ulceración cutánea. En ambos estudios se evidenció peor SG, control local y SLC (87,97).

Otros factores clínicos

Otros factores han sido evaluados solamente en alguno de los ensayos clínicos, mostrando datos discrepantes. Así, las cifras bajas de hemoglobina se comportan como factor pronóstico negativo para muerte secundaria a cáncer de

ano (93,104), SLP o SLC (96). Se ha planteado que la anemia podría favorecer la hipoxia y secundariamente la radiorresistencia (93,105,106).

La afectación tumoral de más de 2/3 de la circunferencia del canal anal parece ser un fuerte factor pronóstico negativo para SLC en el análisis conjunto del estudio fase III ACCORD 03 y el fase II KANAL(97). No obstante, previamente no mostró diferencias significativas en el estudio de la EORTC para control local o SG (87).

Por otro lado, el ensayo clínico ACT I y el estudio de Bilimoria mostraban que a mayor edad existe peor SG (93,98), mientras que en el análisis de Faivre *et al.* los pacientes mayores de 55 años tenían mayor SLC (97).

2.5.2 Biomarcadores moleculares en muestra tumoral

Infección del VPH. Inmunoexpresión p16

Al igual que en otras neoplasias relacionadas con el VPH, diferentes estudios en carcinoma epidermoide de ano muestran el papel pronóstico favorable de la infección por VPH tanto para SLP como para SG (82,100,101,107). La infección por VPH parece conllevar una mayor sensibilidad a la quimio-radioterapia por diferentes mecanismos. Sorprendentemente, el estudio con mayor tamaño muestral concluye que su papel pronóstico para SG se da únicamente en los varones, mientras que en las mujeres, la infección por VPH tiende a ser un factor de mal pronóstico (101).

Por otro lado, el análisis multivariante de alguno de estos estudios concluye que la expresión de p16 (y no la infección del VPH) es el factor pronóstico independiente positivo para SLP y SG (100). Aunque la expresión por

inmunohistoquímica de p16 se puede considerar un marcador subrogado de infección del VPH en carcinoma epidermoide de ano, no todos los tumores con detección del genoma viral presentan expresión de p16 y viceversa. Varios estudios han evaluado el papel pronóstico de la combinación de estas dos variables en carcinoma epidermoide de ano (81,83,108,109). El metanálisis de Sun G *et al.*, confirma que los casos VPH (+) p16 (+) presentan mejor pronóstico que los pacientes VPH (-) p16 (-), con una reducción de riesgo de recaída y de muerte del 77% y 70% respectivamente (110). Además, dentro del subgrupo de tumores p16 (+), aquellos con presencia de ADN VPH (+) tienen mejor pronóstico que los VPH (-), lo que podría indicar en el segundo grupo una patogénesis diferente no relacionada con el VPH, sino con otras alteraciones moleculares como por ejemplo mutaciones en *RB1* (83). Por otro lado, los pacientes con carcinoma epidermoide de ano VPH (+) p16 (+) también parecen presentar mejor pronóstico que los VPH (+) p16 (-) con una HR 0,47, aunque sin alcanzar la significación estadística. La ausencia de expresión de p16 a pesar de la presencia de genoma viral podría indicar una patogénesis independiente de la acción de oncogenes de VPH, lo que explicaría la mayor frecuencia de mutaciones sobre *TP53*.

Otros biomarcadores

El papel de otros biomarcadores sobre la pieza tumoral está muy poco estudiado, y los pocos trabajos que lo analizan son, en general de escaso tamaño muestral, retrospectivos, sobre poblaciones de pacientes heterogéneas y con técnicas poco precisas y subjetivas como la inmunohistoquímica, lo que dificulta la

obtención de conclusiones sólidas al respecto. A continuación, se describen los más relevantes:

Inmunohistoquímica

La inmunoeexpresión nuclear de p53 en más del 5% de células tumorales se ha analizado en múltiples estudios, siendo positiva en el 34-100% de los casos, sin encontrar valor pronóstico en la mayoría de los estudios (111–113).

La expresión de p21 en carcinoma epidermoide de ano también ha sido evaluado por inmunohistoquímica con frecuencias de expresión en torno al 70%, y hallazgos discordantes respecto a su papel pronóstico, encontrando en algún estudio peor SG o riesgo de fallo locorregional (113–115).

La ciclina A está involucrada en el ciclo celular, y concretamente en la entrada de fase G1 a S y de fase G2 a M. Un estudio demostró que la expresión por inmunohistoquímica en más del 20% de células tumorales se asocia a un pronóstico favorable en términos de SG y recaída loco-regional, lo que podría indicar que es un marcador de radiosensibilidad (115).

La vía de RAS ha sido muy estudiada en carcinoma epidermoide de ano. El 50-100% de los casos presentan inmunoeexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), con resultados completamente contradictorios respecto a su papel pronóstico. Existen estudios que lo asocian a mejor pronóstico (116), pero también a peor pronóstico (117), y otros que no encuentran relación (118,119). Hay que tener en cuenta, además, la baja o nula frecuencia de mutaciones de EGFR y de otros miembros de la vía de señalización como RAS o BRAF (120,121), así como la ausencia de

amplificaciones de EGFR en carcinoma de ano (118), lo que pone aún más en duda la relevancia pronóstica de la expresión de esta proteína.

La desmogleína-1 (DSG1) y desmocolina-1 (DSC1) son componentes de los desmosomas, que intervienen en la unión intercelular. La pérdida de adhesión celular favorece la invasividad y la capacidad metastásica de las células tumorales. Un estudio reciente muestra sorprendentemente, que la pérdida de expresión membranosa de DSG1 y de DSC1 en citoplasma se asocia a mejor SG en carcinoma epidermoide de ano (122). Por tanto, la función de DSG1 y DSC1 podría ir más allá del simple anclaje celular, interviniendo en procesos celulares como la apoptosis (123) o la señalización de la morfogénesis (124).

RBP-J interacting and tubulin-associated protein (RITA) es un regulador negativo de la vía Notch. La alta expresión de esta proteína evaluada por inmunohistoquímica se ha asociado a menor SLP y SG (125).

Mutaciones

El *International Cancer Genome Consortium* (ICGC) es un extraordinario proyecto internacional, cuyo objetivo principal es generar catálogos completos de las alteraciones genómicas presentes en 50 tipos y/o subtipos de cáncer diferentes sobre 25.000 muestras de tumor, a través de 90 proyectos en 17 jurisdicciones (figura 4). Sin embargo, entre estos 50 tipos y subtipos de cáncer no figura el carcinoma escamoso de ano, lo que limita el conocimiento de esta patología.

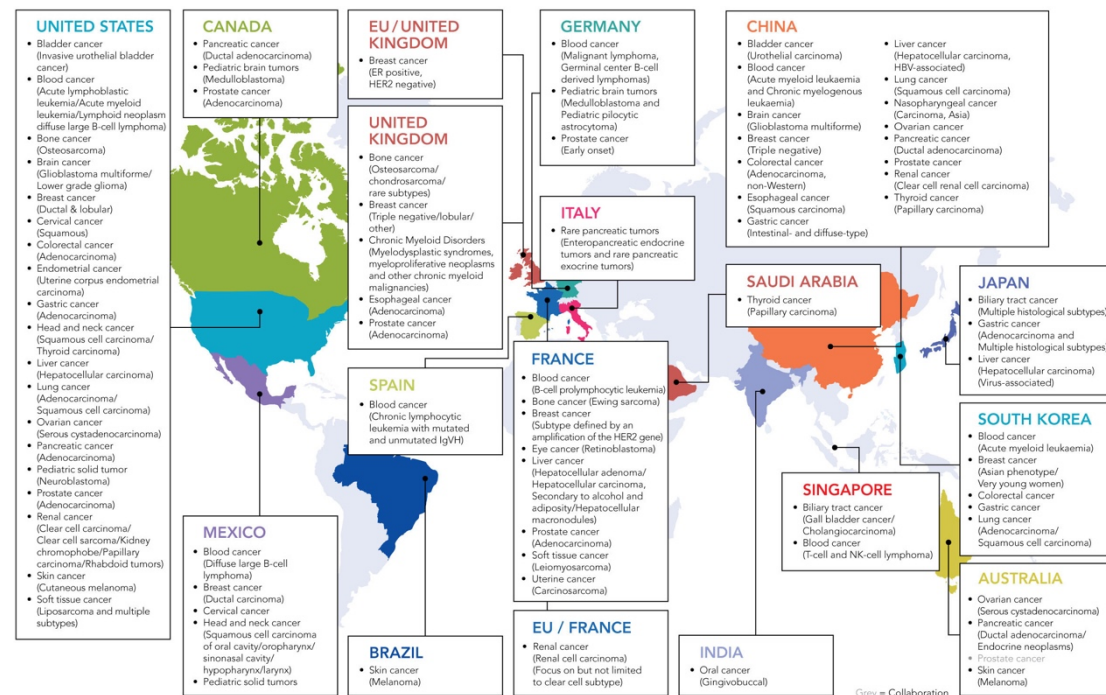


Figura 4. Proyectos y países participantes en el ICGC (126)

Recientemente se han realizado varios estudios de pequeño tamaño muestral que, a través del análisis mutacional de diferentes paneles de genes o incluso secuenciación del exoma han establecido algunas alteraciones genómicas frecuentes en esta entidad, como mutaciones en *PIK3CA* (20-36%), *RRBP1* (18-29%), *MLL3* (25-39%), *MLL2* (16-22%), *TP53* (10-28%), *EP300* (10-22%), *FBXW7* (6-19%) o *FAT1* (18%) (127–131). Aún con escasa consistencia y datos discordantes, la presencia de mutaciones en *PIK3CA*, *EP300* o *FBXW7* podrían asociarse a un pronóstico diferente en esta patología (128,130).

2.5.3 Biomarcadores moleculares en sangre

Los marcadores en sangre periférica tienen ventajas obvias como la posibilidad de una evaluación dinámica durante las diferentes fases del tratamiento y de la enfermedad, pudiendo realizarse en cualquier momento sin riesgos de

complicaciones relevantes para el paciente, a diferencia de otros marcadores como la biopsia tumoral.

La leucocitosis ($>10.000/\text{mm}^3$) y la neutrofilia ($>7.000/\text{mm}^3$) previa al tratamiento quimio-radioterápico han sido validadas retrospectivamente como marcadores pronósticos negativos independientes para SLP y SG con HR superiores a 4 (132,133).

Los niveles elevados en sangre periférica de CYFRA 21-1, un fragmento soluble de la citoqueratina 19, al finalizar la quimio-radioterapia se asocian a una menor SLP y SG de forma estadísticamente significativa, en un estudio retrospectivo sobre una muestra de 82 pacientes (134). La elevación de la concentración serológica pretratamiento de otro marcador sanguíneo, el antígeno del carcinoma de células escamosas (SCCA), se relaciona con una peor SG y SLP (135)

Recientemente se ha analizado el ADN tumoral circulante (ctADN) como factor pronóstico en carcinoma epidermoide de ano VPH (+) localmente avanzado, tratado con quimio-radioterapia concurrente. Aunque los valores de ctADN basales no se relacionan con el riesgo de recaída, la presencia de ctADN residual en los 30 días posteriores a finalizar la quimio-radioterapia se asocia de forma drástica a la recaída. Así, los 3 pacientes que presentaban ctADN presentaron recaída a distancia antes de los 5 meses (136).

2.5.4 Biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento quimio-radioterápico

La respuesta clínica completa puede ser un marcador precoz de SG en oncología. Aunque en cáncer de ano esta correlación no ha sido muy estudiada, la respuesta completa mantenida durante intervalos largos de tiempo se puede considerar un buen marcador. No obstante, existe escasa evidencia de factores predictivos de respuesta completa a quimio-radioterapia concurrente.

Soares et al, encontraron que la infección de VPH, la expresión de p16 y la ausencia de mutaciones sobre *TP53* eran factores predictivos de respuesta completa a los 6 meses y en el análisis multivariante, solamente la infección por VPH mostraba significación estadística (99). La mayor sensibilidad a quimio-radioterapia en los pacientes con infección del VPH podría derivar de una menor capacidad de reparación de las roturas de doble cadena de ADN (137), o de la restauración de la apoptosis celular mediante una regulación positiva de p53 (138).

En un reciente estudio retrospectivo sobre 82 pacientes se ha publicado que los valores normales de CYFRA 21-1 en sangre periférica, tras finalizar la (quimio)-radioterapia concurrente, se asociaban a respuesta tumoral completa (134). Del mismo modo, los niveles normales de SCCA pretratamiento se asocian a mayores tasas de respuesta completa (135). Por otro lado, además del papel pronóstico, a mayor cifra de hemoglobina (por encima de 11g/dL) se incrementan las posibilidades de obtención de remisión completa (104).

2.6 Tratamiento del carcinoma epidermoide de ano

Hasta los años 70 el tratamiento establecido del cáncer de ano no diseminado era la amputación abdomino-perineal con supervivencias del 60% y 40% a los 5 y 10 años respectivamente, reservando la resección local para neoplasias muy localizadas (139). En 1974 Nigro ND *et al.* publicaron su experiencia en varios pacientes con un esquema de tratamiento con intención neoadyuvante, consistente en la combinación de radioterapia (30Gy) con quimioterapia basada en 5-FU (1000 mg/m² días 1-4 y días 29-32) y mitomicina (10 a 15 mg/m² el día 1) (140). En estudios posteriores se corroboró la elevada tasa de respuestas completas que evitarían una cirugía mutilante y se sugería además el posible beneficio de la combinación de quimio-radioterapia con 5-FU y mitomicina respecto a la administración exclusiva de radioterapia (141,142). Hubo que esperar hasta la década de los 90 para confirmar el beneficio de la adición de quimioterapia al tratamiento radioterápico en varios ensayos clínicos aleatorizados, alcanzando tasas de control local en torno al 75% a 5 años, un 20% en términos absolutos superior a esquemas de radioterapia sola o en combinación exclusiva con 5-FU, permitiendo reducir la necesidad de colostomía (87,88,143). No obstante, no se evidenció beneficio en SG.

Con intención de mejorar estos resultados posteriormente se han desarrollado estudios con diferentes estrategias que incluyen la sustitución de mitomicina por cisplatino (89,90), el tratamiento quimioterápico de inducción o consolidación (89–91), o la administración de mayores dosis de radioterapia, sin encontrar beneficio (91). Por tanto, el tratamiento actual estándar presenta leves modificaciones del esquema propuesto por Nigro ND, manteniendo la misma dosis de 5-FU con mitomicina a 10 mg/m² los días 1 y 29, con un máximo de 20

mg de mitomicina por día según las guías de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) o 12 mg/m² el día 1 exclusivamente según las guías europeas (8), con un máximo de 20 mg al día. De forma concurrente se administran 45-50 Gy de radioterapia externa con un *boost* adicional de 10-14 Gy en estadios T3, T4 o con afectación ganglionar. Aunque un ensayo clínico demostró peor SLP y SG en los pacientes tratados con cisplatino vs mitomicina (89), la existencia de otro gran ensayo clínico que no muestra diferencias (90), así como la mejor tolerancia hematológica del cisplatino permite que el uso de éste en lugar de mitomicina también sea una opción de tratamiento razonable.

El tratamiento de la enfermedad avanzada está basado en esquemas de platino, 5-FU y taxanos. Recientemente se han comunicado los resultados de un ensayo clínico fase II aleatorizado, que muestra un beneficio en SG y mejor tolerancia para la combinación de carboplatino-paclitaxel en comparación con cisplatino-5-FU (144). La inmunoterapia también parece jugar un papel prometedor en el tratamiento del carcinoma epidermoide de ano. Dos estudios han demostrado tasas de respuesta en torno al 20% en pacientes con enfermedad quimiorrefractaria (145,146). Actualmente se está evaluando su papel en la enfermedad localizada.

2.7 Secuenciación del exoma completo mediante técnicas de secuenciación masiva

Las técnicas de secuenciación de nueva generación han permitido un gran avance en el conocimiento de la biología molecular del cáncer. Se han identificado alteraciones genéticas que permiten la iniciación tumoral, el desarrollo de metástasis, así como los genes y mutaciones *driver* de la

enfermedad. Esto ha permitido avances a nivel clínico, como mejorar la clasificación de los tumores, encontrar marcadores pronósticos o el descubrimiento de dianas terapéuticas (147).

En el proceso de secuenciación del ADN se pueden diferenciar 3 fases: preparación de la muestra, secuenciación física y fase de ensamblaje (148).

Preparación de la muestra y formación de librerías.

El primer paso necesario es la fragmentación del ADN que permitirá su secuenciación simultánea. La fragmentación se puede hacer mediante medios enzimáticos o medios mecánicos. Una vez el ADN está fragmentado, se procede a ligar los extremos del fragmento con un adaptador, consistente en una secuencia de ADN complementaria a cebadores universales.

Para aquellos casos donde solamente se requiera secuenciar determinadas regiones del ADN, por ejemplo, para el exoma completo, será necesario realizar un paso previo a la secuenciación, consistente en la captura o enriquecimiento de las secuencias que se quieren analizar.

La captura de secuencias exónicas se realiza mediante hibridación con fragmentos de ADN específicos y complementarios a dichas regiones (149) (figura 5). En la captura por hibridación en fase sólida, estas sondas de oligonucleótidos se encuentran unidas a una superficie sólida (microarrays) mediante enlaces covalentes. Al añadir los fragmentos de ADN desnaturalizados de la librería, solamente aquellos con secuencias exónicas hibridan con las sondas, mientras que el resto de los fragmentos quedarán libres y serán eliminados tras lavado (150). En la captura por hibridación en solución las

sondas están biotiniladas y son capturadas por perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (151).

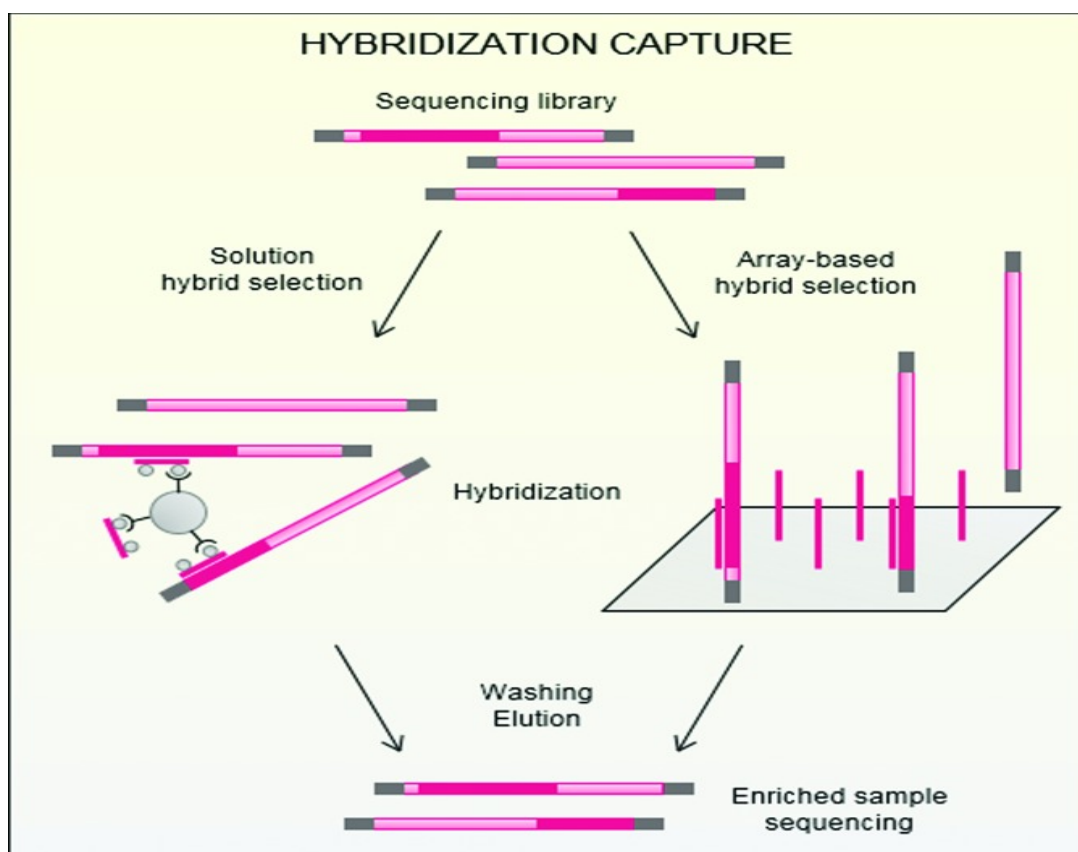


Figura 5. Proceso de captura de fragmentos de ADN por hibridación³

Tras la formación de las librerías, en la mayoría de los casos se realiza amplificación de los fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permitirá una mejor detección de la señal por los sistemas de lectura. Existen varios mecanismos de amplificación, los más comunes son sobre superficie sólida, o aquellos basados en perlas. En la amplificación en fase

³ Imagen original de Gasc C, Peyretailade E, Peyret P. Sequence capture by hybridization to explore modern and ancient genomic diversity in model and nonmodel organisms. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jun 2;44(10):4504–18 (149), con permiso de Oxford University Press.

sólida, los cebadores, complementarios a adaptadores ligados a los fragmentos de ADN, se encuentran fijados de forma covalente al soporte sólido. El adaptador del fragmento de ADN se une al cebador inmovilizado en el soporte sólido. A partir de este fragmento de ADN se forma una cadena doble de ADN, desde el cebador inmovilizado. Esta segunda cadena de ADN se encuentra fijada al soporte sólido, mientras que la inicial queda liberada. La amplificación tendrá lugar mediante la formación de puentes de doble cadena de ADN. Otro mecanismo de amplificación está basado en perlas en emulsión. En este caso, los cebadores donde hibridan los adaptadores están fijados a pequeñas bolas que se encuentran en micelas y la amplificación se realiza mediante PCR en emulsión, de forma que cada bola queda cubierta por miles de copias del mismo fragmento de ADN (152,153).

Secuenciación

Existen varias tecnologías para la secuenciación masiva en paralelo (152,154–156). La secuenciación de lectura corta es la más desarrollada y necesita habitualmente amplificación por PCR. Dentro de estos sistemas de secuenciación existen dos tecnologías principales, la secuenciación por síntesis (secuenciación por terminación reversible cíclica y secuenciación por adición de nucleótido único) y la secuenciación por ligación (152).

La secuenciación por terminación reversible cíclica es la más relevante en la actualidad (152,156). La síntesis de ADN se produce a partir del fragmento de ADN. Para ello se utilizan nucleótidos modificados, marcados con fluorocromos diferentes, y bloqueados de forma reversible en el extremo 3'. En cada ciclo, la

ADN polimerasa añade un único nucleótido marcado al cebador hibridado a la cadena de ADN a secuenciar. Este nucleótido paraliza reversiblemente la polimerización, y se realiza un lavado que elimina los nucleótidos libres. Posteriormente se realiza la lectura del nucleótido incorporado a la cadena de síntesis de ADN. El siguiente paso es la liberación del fluorocromo y de la terminación que bloquea la síntesis de ADN. Se realiza un nuevo lavado y se repite nuevamente el ciclo. El otro método de secuenciación por síntesis es por adición de nucleótido único, donde los nucleótidos no están modificados y se basa en la detección de iones de hidrógeno que se liberan durante cada adición de nucleótido a la cadena.

La secuenciación por ligación utiliza una ADN ligasa, en lugar de la ADN polimerasa y sondas de dos nucleótidos marcados con un fluorocromo cada uno. En el primer ciclo, la sonda complementaria a la secuencia de ADN que sigue al cebador es ligada por la ADN ligasa, se lava el resto de sondas y posteriormente se recoge la imagen de la sonda unida para su identificación posterior. Otras tecnologías están basadas en la secuenciación de iones de hidrógeno, pirosecuenciación o secuenciación en tiempo real.

Por otro lado, existen nuevas aproximaciones a la secuenciación masiva, que suponen los comienzos de la secuenciación de tercera generación. Estas nuevas técnicas se caracterizan por secuenciar en tiempo real (sin pausa después de cada base), ser capaces de realizar lecturas de cadena larga sin necesidad de amplificación previa. Estas características permiten una cobertura más homogénea, menor número de errores potenciales y mejor resolución (156).

Ensamblaje

Consiste en alinear las secuencias de ADN de cada fragmento obtenidas tras la secuenciación. Un *software* bioinformático permite alinear lecturas superpuestas para reconstruir el genoma original.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Justificación

Desde que en la década de los 90 se confirmara el beneficio de la asociación de quimioterapia a la radioterapia en el tratamiento del carcinoma epidermoide de ano localizado, no se ha conseguido ningún avance terapéutico en este escenario (87,88). Con este esquema de tratamiento quimio-radioterápico basado en mitomicina y 5-FU se consigue una SG a 5 años en torno al 60-75%, con tasas de recaída a los 5 años del 30% y recaídas a distancia superiores al 10% (87–91). Aunque los tumores más localizados alcanzan tasas de curación del 90%, en aquellos casos con afectación local más avanzada (T3 o T4), o con afectación ganglionar, la SLE a 3 años es del 50% y la SG en torno al 70%. La gran mayoría de las recaídas ocurren durante los 2 primeros años de seguimiento. La administración de estos tratamientos conlleva toxicidades nada desdeñables, fundamentalmente derivadas de la radioterapia como dermatitis, tenesmo, dolor y la estenosis anal, incontinencia fecal o proctitis rádica a largo plazo. A pesar del claro beneficio de la quimioterapia hay que resaltar que un pequeño grupo de pacientes sufrirá complicaciones potencialmente graves, derivadas de la misma como la toxicidad cardiovascular, hematológica o segundas neoplasias (92).

Por otro lado, el ambicioso proyecto del ICGC que está permitiendo avanzar en el conocimiento de las alteraciones genómicas presentes en la gran mayoría de neoplasias, no incluye el carcinoma de ano.

Este contexto clínico reclama un mejor entendimiento del panorama molecular y de las diferentes vías celulares que regulan la patogénesis de esta entidad, con

objeto de encontrar biomarcadores pronósticos de recaída, realizar una mejor selección de pacientes para la administración de tratamientos agresivos, seleccionar biomarcadores predictivos de beneficio al tratamiento e identificar nuevas dianas terapéuticas.

Para ello son necesarios nuevos estudios prospectivos sobre muestras homogéneas basados en técnicas objetivas y complementarias como es la secuenciación completa del exoma.

3.2 Hipótesis

Mediante la secuenciación del exoma completo sobre muestras tumorales conservadas en parafina se podrán identificar las mutaciones y vías de señalización que regulan la patogénesis del carcinoma epidermoide de ano localizado. Asimismo, se podrán identificar variantes genéticas potencialmente relacionadas con diferentes características clínico-patológicas y posibles variantes con valor pronóstico.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo principal

1. Identificar los genes con variantes de alto impacto y su frecuencia, en carcinoma epidermoide de ano localizado, evaluados mediante secuenciación del exoma completo de tejido tumoral conservado en parafina.

3.3.2 Objetivos secundarios

1. Establecer las principales vías de señalización alteradas en carcinoma epidermoide de ano localizado a partir de los genes que presentan variantes de alto impacto.
2. Identificar los genes con variantes asociados a características clínico-patológicas: a) VPH, b) Estadío, c) Afectación ganglionar y d) VIH.
3. Determinar aquellos genes con variantes asociados a supervivencia libre de enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

Estudio multicéntrico retrospectivo observacional.

El estudio ha sido realizado de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki y las guías de Buenas Prácticas Clínicas. Todos los pacientes procedentes del ensayo clínico VITAL (NCT01285778) incluidos en este proyecto firmaron el consentimiento informado para el estudio paralelo de factores predictivos moleculares. El comité ético de cada centro participante aprobó el protocolo del estudio. Los pacientes incluidos procedentes de la práctica clínica asistencial firmaron el consentimiento informado del biobanco y, para aquellos casos donde no fue posible la obtención del consentimiento escrito por éxitus, se solicitó la muestra acorde con la Ley de Investigación Biomédica 14/2007.

4.2 Población del estudio

Se incluyeron pacientes con diagnóstico histológico de carcinoma escamoso de ano infiltrante localizado. Debido a la escasa incidencia de esta neoplasia, y la dificultad para la disposición de muestra tumoral, los pacientes de la práctica clínica asistencial proceden de un período de tiempo dilatado, pero con características clínicas homogéneas. Por un lado, se incluyeron pacientes procedentes del ensayo clínico VITAL (GEMCAD-09-02, NCT01285778) que abarca 25 hospitales nacionales, y por otro lado pacientes de práctica clínica habitual procedentes de los hospitales universitarios de La Paz de Madrid y Clinic de Barcelona, diagnosticados entre el 1 de enero de 2006 y el 31 de diciembre de 2016.

4.2.1 Criterios de inclusión de los pacientes

1. Edad ≥ 18 años.
2. Diagnóstico histológico de carcinoma epidermoide de ano
3. Estadio I, II o III según la clasificación TNM 6ª edición AJCC
4. Ausencia de enfermedad metastásica mediante pruebas de imagen
5. Disponibilidad de muestra tumoral suficiente fijada en formol y embebida en parafina (FFPE)
6. Muestra tumoral extraída previa al inicio de tratamiento quimio-radioterápico
7. Disponibilidad de acceso a datos clínicos

4.2.2 Criterios de selección de la muestra tumoral

Las muestras fueron revisadas por un patólogo experto en tumores digestivos.

Todas las muestras contenían al menos un 70% de células tumorales.

4.3 Variables clínicas y anatomo-patológicas

1. Fecha de nacimiento
2. Edad al diagnóstico de cáncer de ano
3. Sexo
4. Infección por VIH
5. Escala ECOG al diagnóstico (0, 1, 2, 3, 4)
6. Localización (margen anal versus canal anal)
7. Presencia de VPH en el tumor
8. Genotipo de VPH en el tumor
9. Tamaño del tumor: menor o igual a 5 cm versus mayor a 5 cm

10. Afectación ganglionar radiológica (si o no)
11. Estadio TNM según la 6ª edición AJCC
12. Tratamiento inicial (quimio-radioterapia versus radioterapia vs cirugía)
13. Tratamiento quimioterápico (si o no)
14. Tratamiento radioterápico (si o no)
15. Fecha de inicio del tratamiento inicial
16. Fecha de finalización de tratamiento inicial (quimio-radioterapia, cirugía o radioterapia sola)
17. Esquema de quimioterapia administrada (mitomicina-5-FU o mitomicina-capecitabina, mitomicina-5-FU-panitumumab, cisplatino-5-FU)
18. Respuesta completa (si o no)
19. Recidiva tumoral (si o no)
20. Fecha de recidiva
21. Localización de la recidiva (local vs metástasis vs local y metástasis)
22. Éxito (si o no)
23. Fecha de éxito
24. Fecha de último seguimiento
25. Supervivencia libre de enfermedad
26. Supervivencia global
27. Tiempo de seguimiento

4.4 Secuenciación del exoma

4.4.1 Aislamiento del ADN

Una sección de 10 mm de cada muestra tumoral de FFPE fue desparafinizada y el ADN se extrajo mediante el *kit GeneRead ADN FFPE* (Qiagen), siguiendo las

instrucciones del fabricante. Una vez extraído, el ADN fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

4.4.2 Control de calidad del ADN aislado

Se realizó un control de calidad del ADN aislado evaluando la concentración de doble cadena de ADN mediante PicoGreen®, y el tamaño medio controlado por electroforesis gel.

4.4.3 Preparación de las muestras y secuenciación del exoma completo

Se fragmentó el ADN genómico por métodos mecánicos (bioruptor) a un tamaño medio de unos 200 pares de bases. Posteriormente, los fragmentos de doble cadena de ADN fueron fosforilados, incorporándose las secuencias adaptadoras, y siendo identificados mediante secuencias explícitas de Illumina añadidas por PCR (*Kapa DNA library age unit*).

La captura del exoma se realizó utilizando el sistema VCRome (tamaño de captura de 37 Mb, Nimblegen) empleando un multiplexado de 8 muestras para cada reacción de captura. La captura se realizó siguiendo las instrucciones de enriquecimiento de Nimblegen. Después de la captura, las bibliotecas se purificaron, se midieron y se valoraron mediante PCR en tiempo real antes de la secuenciación. Posteriormente los fragmentos de ADN se secuenciaron a una cobertura aproximada de 4.5 Gb por muestra en un equipo Illumina-NextSeq NS500 (Illumina Inc.), utilizando cartuchos de alto rendimiento de 150 ciclos (2x75). Se eliminaron los adaptadores de Illumina y los fragmentos resultantes se mapearon contra el exoma humano utilizando el archivo de referencia proporcionado por Nimblegen.

4.4.4 Procesamiento de los datos tras la secuenciación

La calidad de los experimentos de secuenciación del exoma se realizó mediante FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). En primer lugar, se eliminaron los cebadores utilizando Cutadapt (157). Luego, los archivos FASTQ fueron filtrados por calidad por PrinSeq (158).

La alineación de las secuencias se realizó contra el genoma humano h19 basándose en las herramientas BWA (159), Samtools (160) y Picard Tools (<http://picard.sourceforge.net>).

La llamada de variantes se realizó utilizando la herramienta MuTect del paquete GATK4(161) combinado con PicardTools, en primer lugar, para crear un panel de normales (162) y, en segundo lugar, para llamar a las variantes.

El panel de normales se construyó utilizando 11 muestras de exomas ibéricos de la base de datos 1000genomas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>).

4.5 Análisis de genotipo de VPH

El genotipado de VPH se realizó a partir del sistema de detección CLART® VPH2, que permite detectar infecciones y coinfecciones de 35 genotipos del VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89). Se siguió el protocolo especificado, que se resume a continuación.

1. Extracción del ADN mediante GeneRead DNA FFPE (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído, el ADN fue almacenado a -80°C hasta su utilización
2. Se realizó la amplificación de un fragmento de la región L1 del virus mediante PCR, a partir de 5 µl del ADN extraído. El fragmento de ADN

que se amplifica presenta variaciones específicas para cada uno de los genotipos de VPH, lo que permitirá su identificación mediante sondas específicas.

3. Los fragmentos de ADN amplificados se marcaron con biotina.
4. Este fragmento de ADN de interés amplificado se vierte en un pocillo donde se encuentran fijadas todas las sondas específicas para cada genotipo de VPH.
5. Las sondas hibridan con los fragmentos de ADN complementarios.
6. A continuación, tiene lugar la unión de la biotina con el conjugado de estreptavidina-peroxidasa, seguida de una incubación con o-dianisidina, sustrato de la peroxidasa. Esto genera un precipitado en el área donde ha tenido lugar la hibridación.
7. La visualización del producto amplificado se realizó mediante autoclart®, que realiza una imagen gráfica de los pocillos y posteriormente se utiliza un *software* de procesamiento de imagen.

4.6 Filtrado y validación de las variantes genéticas de alto impacto

4.6.1 Filtrado de las variantes genéticas de alto impacto

Con intención de identificar las variantes genéticas más relevantes en el carcinoma escamoso de ano se realizó un filtrado restrictivo de variantes de alto impacto (163) (figura 6).

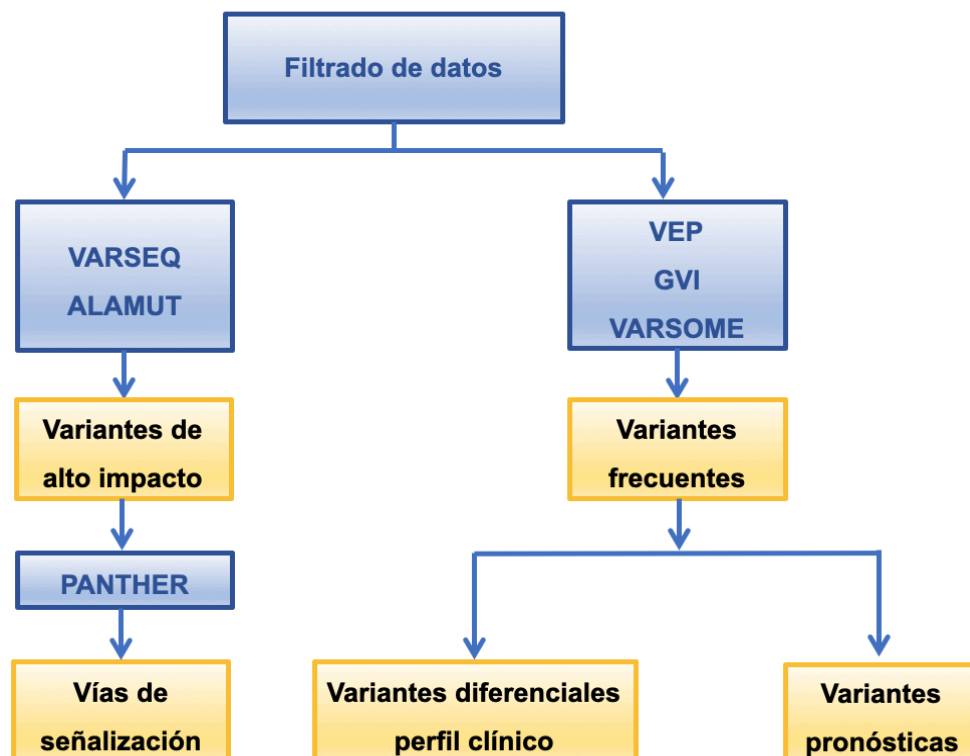


Figura 6. Esquema de la metodología empleada para el filtrado y posterior análisis de datos

Este filtrado se realizó con el *software* VarSeq™ (V2.1.0, GoldenHelix, Bozeman, MT, www.goldenhelix.com) (164). Se consideró variante de alto impacto de acuerdo a los siguientes criterios: 1) Profundidad de lectura de al menos 15x, 2) Frecuencia global de acuerdo a la base de datos gnomAD inferior al 1% (165), 3) Variante detectable en al menos el 15% de las lecturas y 4) Impacto alto de la variante sobre la proteína (tabla 2). Posteriormente se validaron las variantes visualmente mediante Alamut.

Se entiende por variante con alto impacto aquella variante que tiene un impacto disruptivo en la proteína, causando probablemente, el truncamiento de la misma, o su pérdida de función. Se incluyeron las variantes de tipo *frameshift*, y pérdida o ganancia del codón *stop* (*stop lost* o *stop gained*) (figura 7). Sin embargo,

variante con impacto moderado es aquella variante no disruptiva que podría cambiar la efectividad de la proteína (166).

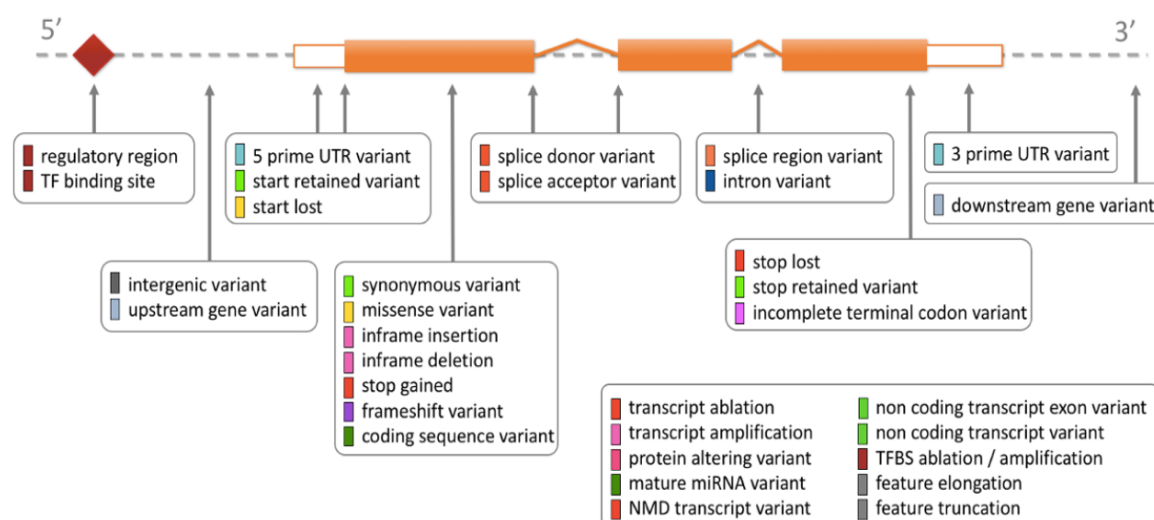


Figura 7. Esquema representativo de los tipos de variantes según la localización de la región genómica de transcripción (166)

Característica	Variantes alto impacto	Variantes frecuentes
Software	VarSeq™ y Alamut	VEP y IGV
Frecuencia Global gnomAD	<1%	<1%
Profundidad de lectura del gen	≥15x	NO
Umbral detección de lecturas	≥15%	NO
Impacto de las variantes	Alto	Alto y moderado
Frecuencia de variantes mínima	NO	>10%

Tabla 2. Criterios de filtrado de variantes de alto impacto y de variantes frecuentes

4.6.2 Validación de las variantes genéticas de alto impacto

Se revisaron todas las variantes obtenidas tras el análisis por VarSeq™ mediante Alamut Visual v2.11(*Interactive Biosoftware*). Se rechazaron aquellas variantes identificadas previamente por VarSeq™, que tras el análisis por Alamut Visual v2.11 únicamente fueron detectadas en una cadena o con una frecuencia baja.

4.7 Análisis de los procesos biológicos y de las vías de señalización

4.7.1 Procesos biológicos

Para la identificación de los procesos biológicos celulares en los que están involucrados los genes con variantes de alto impacto en carcinoma escamoso de ano se utilizó la base de datos PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) (167,168). Se seleccionó “*Homo sapiens*” como organismo, “*functional classification viewed in graphic charts*” como análisis y “*biological process*” en ontología.

4.7.2 Vías de señalización

Para la identificación de las vías de señalización en las que están involucrados los genes afectados de variantes de alto impacto se utilizó la base de datos PANTHER (167,168). Se seleccionó “*Homo sapiens*” como organismo, “*functional classification viewed in graphic charts*” como análisis y “*pathway*” en ontología.

4.8 Filtrado de las variantes genéticas frecuentes

Para establecer las variantes genéticas asociadas con el pronóstico y con las características clínico-patológicas se realizó un filtrado menos restrictivo. Las

variantes fueron anotadas utilizando *Variant Effect Predictor* (VEP) (169) (tabla 2)

Los criterios de filtrado fueron los siguientes: 1) Frecuencia en la población general de acuerdo a la base de datos gnomAD menor al 1%, 2) Impacto alto o moderado de la variante y 3) Presencia de la variante en nuestra cohorte en al menos el 10% de los pacientes (tabla 2). Se confirmaron todas las variantes visualmente, utilizando *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (170). La base de datos Varsome (<https://varsome.com/>) fue utilizada para encontrar información complementaria sobre algunas variantes.

4.9 Asociación entre variantes genéticas y características clínico-patológicas.

La muestra de pacientes considerada para el análisis de asociación entre variantes genéticas y características clínico-patológicas incluye a todos los pacientes que evidentemente disponen de la información a analizar, pero no se excluyó ningún paciente en función del tratamiento recibido. El listado de genes considerado para el análisis de supervivencia se estableció mediante VEP según se describe más arriba en el apartado correspondiente (tabla 2).

Se realizó un análisis masivo exploratorio cruzando el listado de genes con los factores clínicos dicotómicos. El test estadístico utilizado en el análisis de significación para las tablas de contingencia fue el test exacto de Fisher de dos colas. Aunque se calculó el valor de p de acuerdo al test de Bonferroni, no se utilizó como referencia para establecer los genes diferenciales. Dado el pequeño tamaño muestral y que se trata de un análisis con fines exploratorios se ha considerado la p-valor no ajustada inferior a 0,05. Como medida de asociación

se utilizó el Odds Ratio (OR). Para el análisis se empleó la versión 23.0 del programa informático SPSS.

4.10 Asociación entre características clínico-patológicas o variantes genéticas y supervivencia.

La muestra de pacientes considerada para el análisis de supervivencia excluyó a aquellos pacientes que no recibieron tratamiento quimio-radioterápico concurrente con intención radical. Los pacientes que no habían presentado evento en el momento del final del seguimiento fueron censurados.

Para la estimación de las curvas de supervivencia se utilizó el método Kaplan-Meier. La correlación de cada variable clínica categórica con SLE y SG se realizó a través del test de Log-Rank, teniendo en cuenta un nivel de significación estadística bilateral $\alpha=0,05$ con el programa informático SPSS versión 23.0

El listado de genes considerado para el análisis de supervivencia se estableció mediante VEP según se describe más arriba en el apartado correspondiente. Para el análisis de los genes relacionados con supervivencia libre de enfermedad se utilizó BRB-ArrayTools desarrollado por Dr. Richard Simon. Se generaron curvas de supervivencia para aquellas variables clínicas y genes asociados a supervivencia con un p valor inferior a 0.05 con el programa informático SPSS versión 23.0. Al tratarse de un análisis exploratorio con pequeño tamaño muestral no se realizó ajuste del p-valor a los múltiples test realizados.

Dado el pequeño tamaño muestral y la ausencia de diferencias estadísticamente significativas para las variables clínicas pronósticas clásicas (sexo, VPH, estadio

TNM, N), no se realizó análisis multivariante para los genes que mostraron mejoría en SLE.

4.11 Definición de términos incluidos en los objetivos del estudio

- Respuesta Completa: Ausencia de tumor a los 6 meses de finalizar el tratamiento sin progresión regional ni a distancia. La respuesta fue evaluada clínica y radiológicamente mediante TAC o RMN de acuerdo a la versión 1.1 de los criterios RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*).
- Tasa de Respuesta Completa: Porcentaje de sujetos que han alcanzado respuesta completa.
- Supervivencia Libre de Enfermedad: Número de meses transcurridos entre la primera dosis de tratamiento recibido y la confirmación de progresión de la enfermedad por prueba de imagen o persistencia de enfermedad confirmada por biopsia realizada al menos 6 meses tras finalizar el tratamiento.
- Supervivencia global: Número de meses transcurridos entre la primera dosis de tratamiento recibido y la muerte del paciente por cualquier motivo.
- Tiempo de seguimiento: Número de meses transcurridos desde la primera dosis de tratamiento recibido hasta la fecha última de seguimiento o muerte.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Selección de pacientes. Características clínico-patológicas.

Factores pronósticos clínicos

La figura 8 muestra el diagrama de flujo para la inclusión de pacientes y análisis posterior.

En el análisis de identificación de alteraciones genómicas se incluyeron los 45 pacientes. Para el análisis de variables relacionadas con supervivencia se incluyeron los 41 pacientes que recibieron tratamiento quimio-radioterápico concurrente. Se excluyeron 4 casos: dos casos se trataron exclusivamente con resección del carcinoma de canal anal, un caso fue tratado exclusivamente con radioterapia y otro fue resecado con posterior administración de quimioterapia con intención adyuvante.

La tabla 3, tabla 4 y tabla 5 muestran las características clínicas y anatómo-patológicas de todos los pacientes a los que se realizó secuenciación del exoma de la muestra tumoral y que se incluyeron en el análisis bioestadístico.

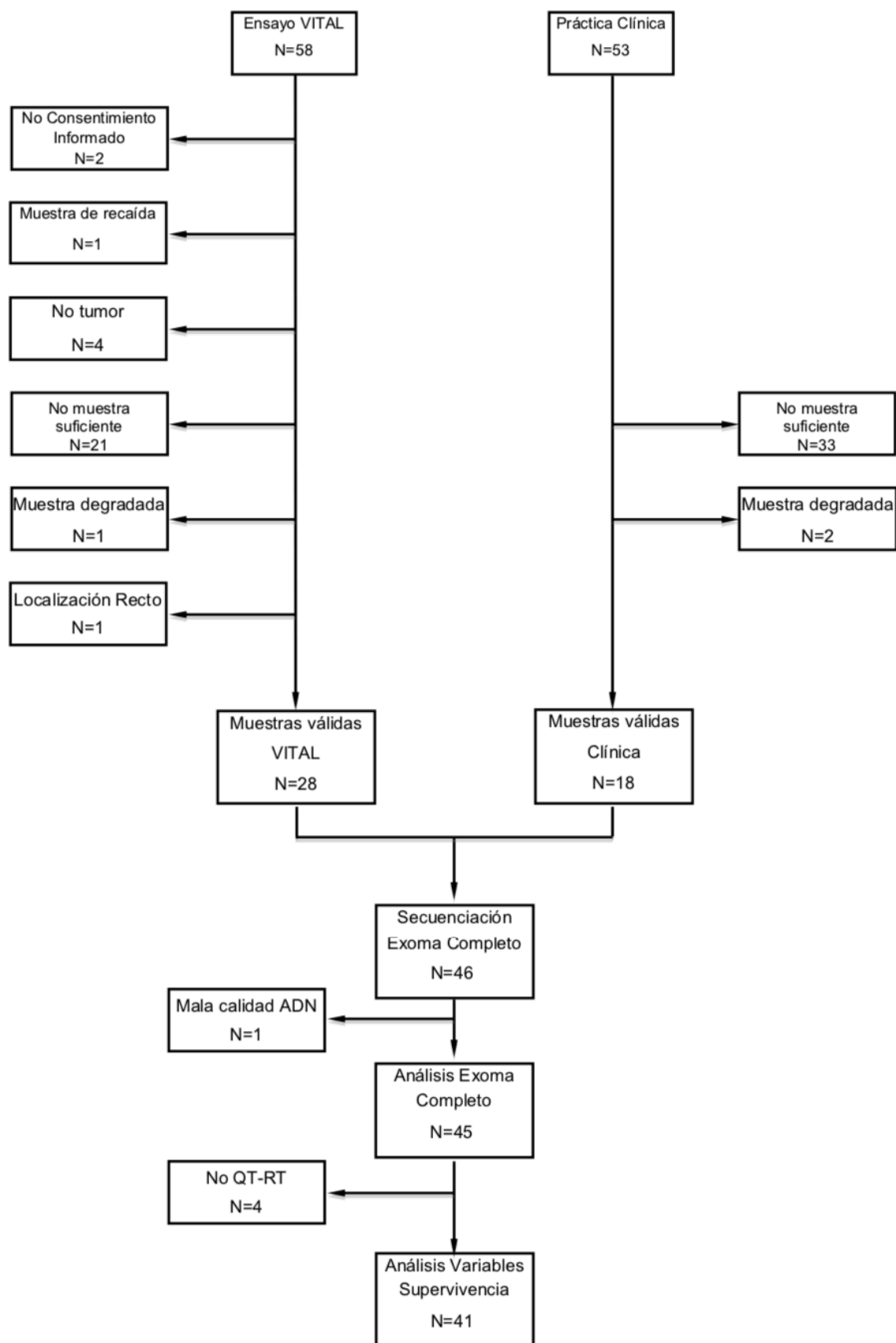


Figura 8. Diagrama de flujo de inclusión y análisis de pacientes

		N=45	Frecuencia
Edad Mediana (Rango)		61	(41-86)
Sexo			
	Hombre	23	51%
	Mujer	22	49%
VPH Alto riesgo			
	Positivo	33	73%
	Negativo	5	11%
	Desconocido	7	16%
VIH			
	Positivo	2	4%
	Negativo	43	96%
Tamaño tumoral			
	T≤5 cm	28	62%
	T>5 cm	12	27%
	Desconocido	5	11%
Afectación ganglionar			
	NO	19	42%
	SI	24	54%
	Desconocido	2	4%
Metástasis	M0	45	100%
Estadio TNM AJCC 6ª edición			
	I	3	7%
	II	16	35%
	III	26	58%
Tratamiento			
	Quimio-radioterapia radical	41	91%
	Otros tratamientos	4	9%

Tabla 3. Características clínico-patológicas

Genotipo VPH (N=33)	N	Frecuencia
16	27	82%
6	1	3%
31	1	3%
51	1	3%
31,51	1	3%
6,16	1	3%
16,33,44,68	1	3%

Tabla 4. Distribución de genotipos de VPH en las muestras tumorales de pacientes

Tratamiento	N	Frecuencia
RT+QT	14	31%
Cisplatino-5-FU	9	
Mitomicina-5-FU	5	
RT+MM-5-FU-Panitumumab	27	60%
Otros	4	9%
Radioterapia sola	1	
Cirugía sola	2	
Cirugía + QT adyuvante	1	
QT: Quimioterapia; 5-FU: 5-Fluorouracilo; MM: Mitomicina		

Tabla 5. Detalle de los tratamientos recibidos

La tasa de respuesta completa entre los 41 pacientes evaluables 6 meses tras finalizar el tratamiento quimio-radioterápico fue del 82,9% (34 casos).

La SLE a 3 y 5 años para los 41 pacientes evaluables para supervivencia fue del 67,4%, con una mediana de seguimiento de 45 meses (figura 9). Trece pacientes presentaron recaída, de ellos, 11 sufrieron recaída local como primera localización, mientras que 2 casos presentaron recaída a distancia.

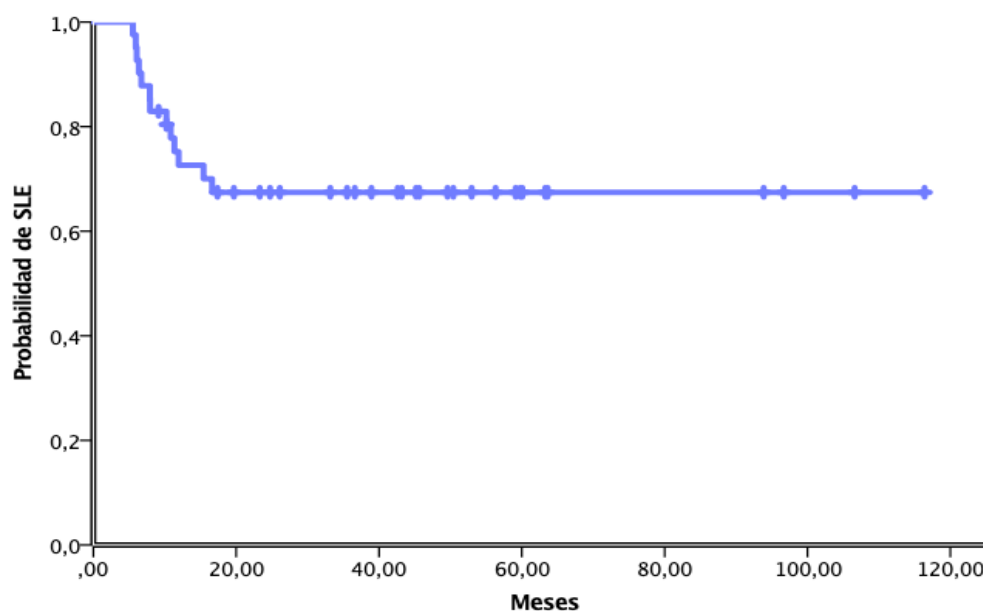


Figura 9. Curva de supervivencia libre de enfermedad (SLE)

La SG a 3 y 5 años para los 41 pacientes que recibieron tratamiento con quimio-radioterapia fue del 78,8% con una mediana de seguimiento de 45 meses (figura 10).

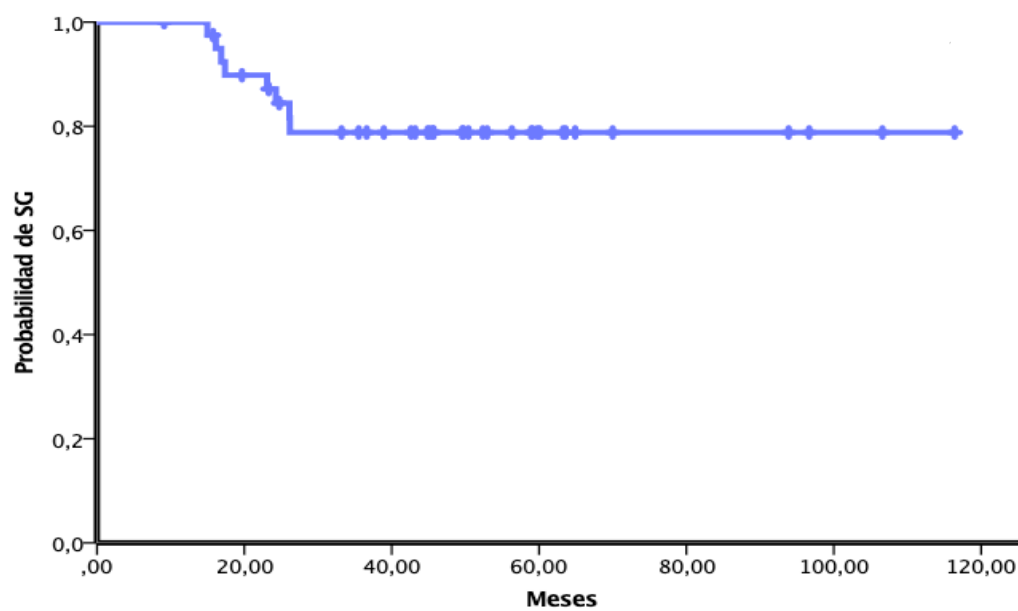


Figura 10. Curva de supervivencia global (SG)

Se analizó la SLE en función de los factores pronósticos clínicos clásicos en carcinoma escamoso de ano localizado (sexo, edad, estadio TNM, presencia de afectación ganglionar), y para la infección de virus del papiloma de alto riesgo, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (tabla 6, figura 11, figura 12, figura 13, figura 14 y figura 15).

Variable		N	p-valor (log Rank)
Sexo		41	p=0,32
Edad	<61años vs ≥61 años	41	p=0,57
VPH	(-) vs (+)	35	p=0,23
TNM	I y II vs III	41	p=0,29
N	(-) vs (+)	39	p=0,32

N: Afectación ganglionar; TNM: Estadio según la clasificación de la AJCC 6ª Edición

Tabla 6. Factores pronósticos clínicos evaluados para supervivencia libre de enfermedad

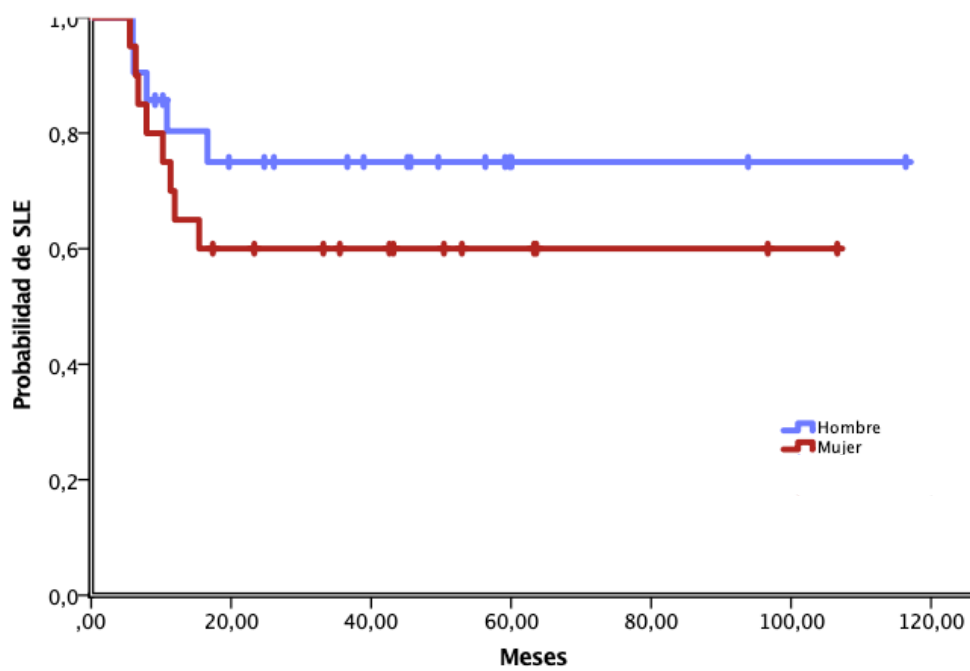


Figura 11. Supervivencia libre de enfermedad en función del sexo

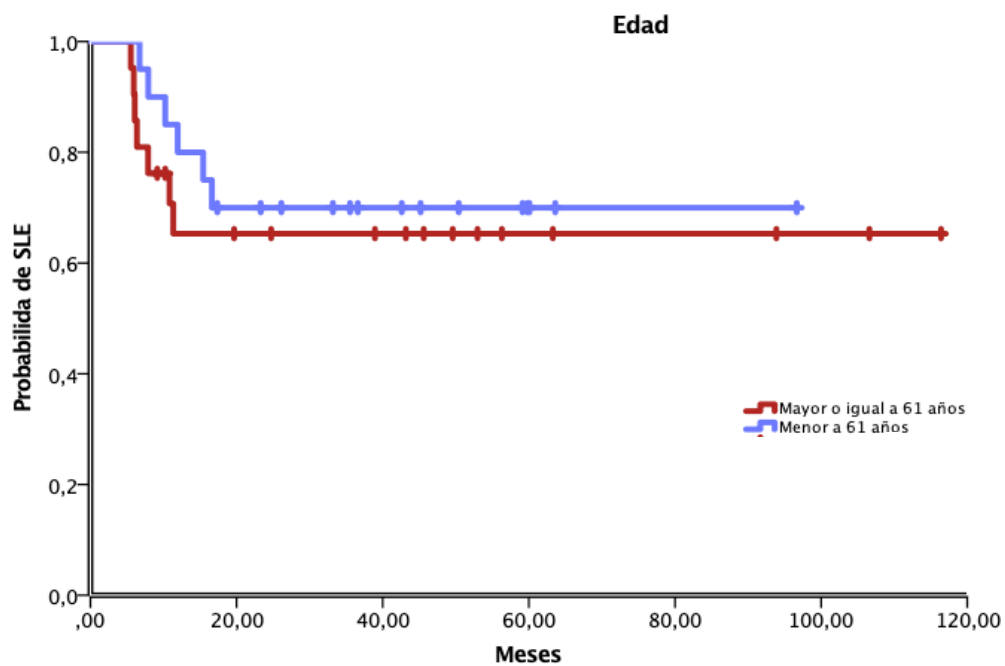


Figura 12. Supervivencia libre de enfermedad en función de la edad

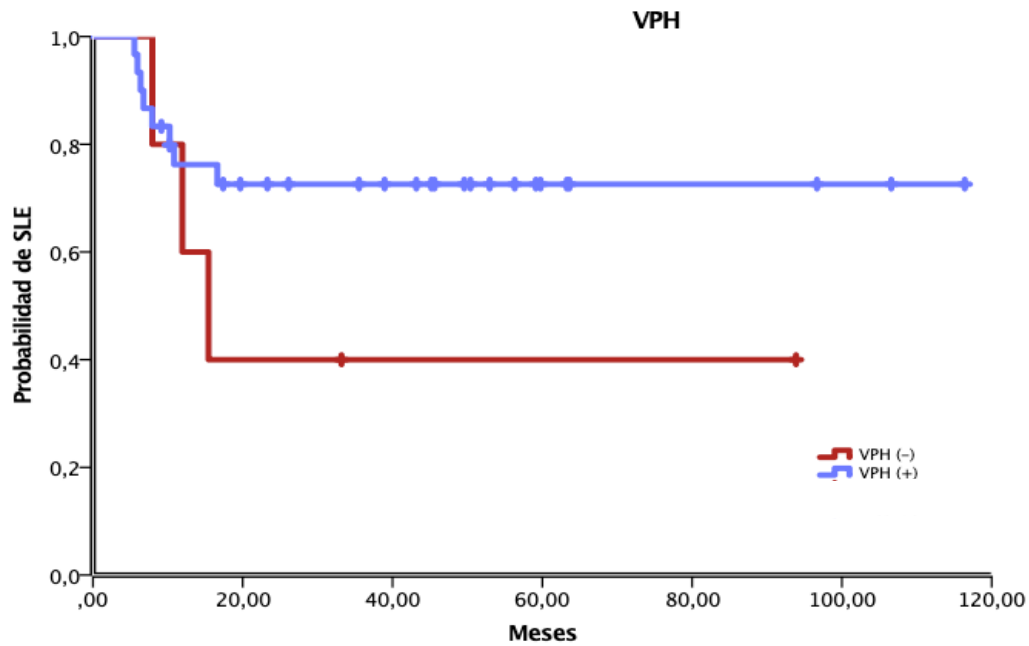


Figura 13. Supervivencia libre de enfermedad en función de la infección por VPH

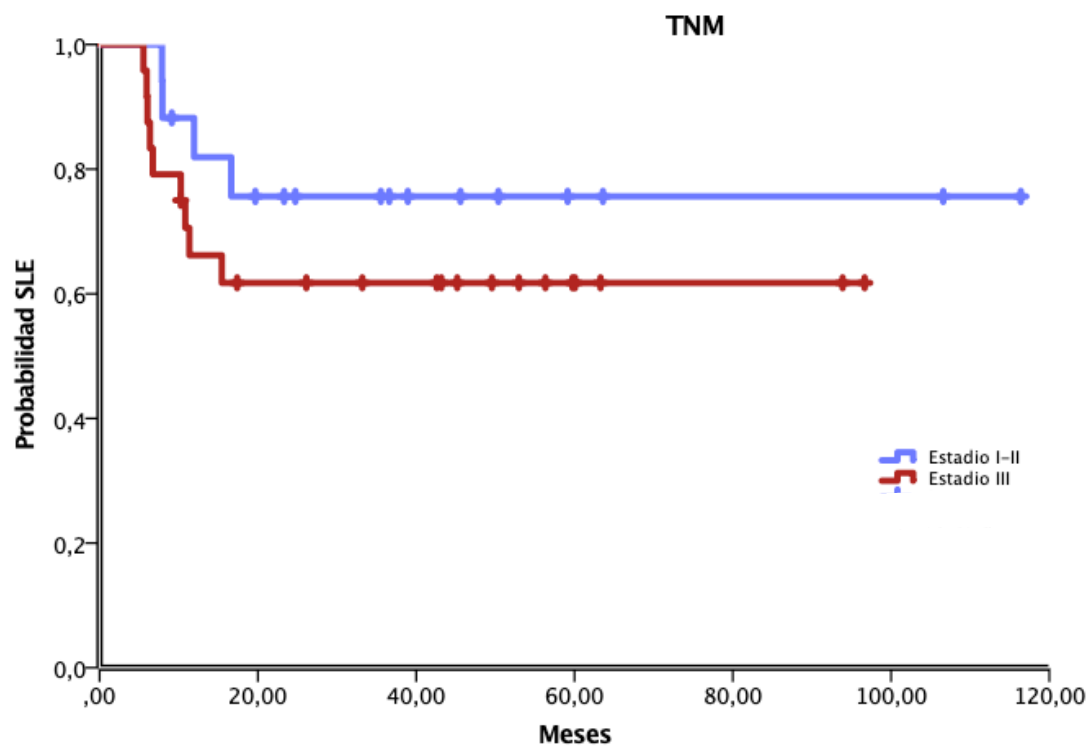


Figura 14. Supervivencia libre de enfermedad en función del estadio TNM de la 6ª edición de la AJCC

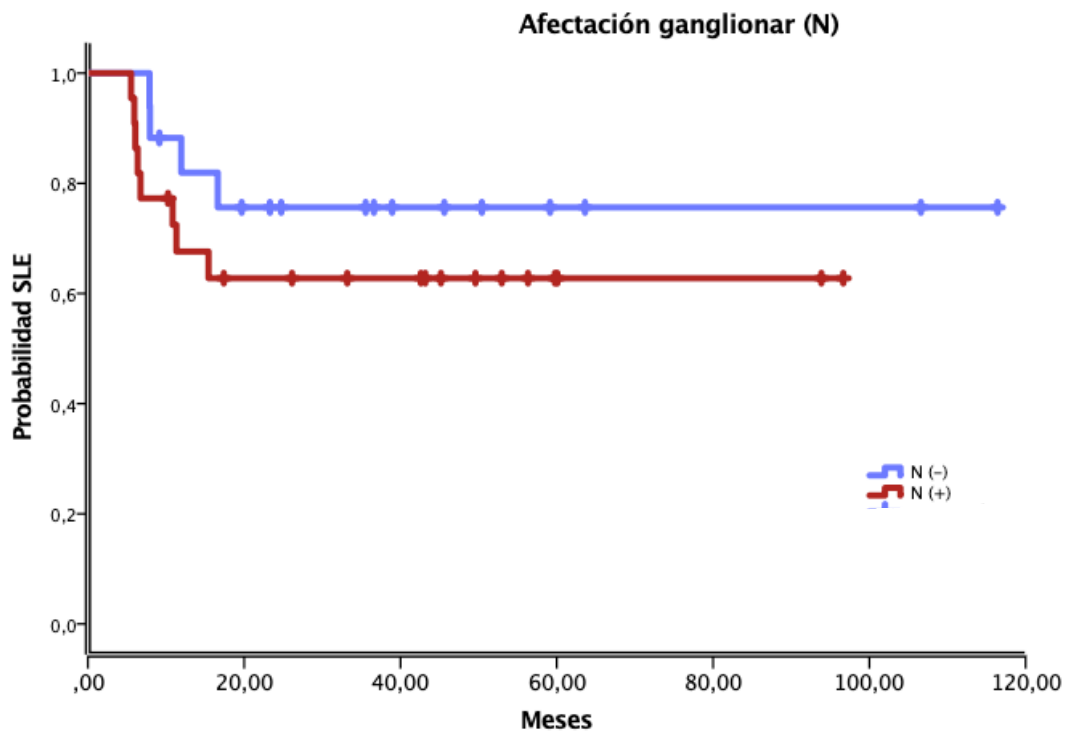


Figura 15. Supervivencia libre de enfermedad en función de la afectación ganglionar

5.2 Variantes genéticas de alto impacto

La secuenciación del exoma completo se realizó sobre 46 muestras de pacientes diagnosticados de carcinoma escamoso de ano. La cobertura media obtenida fue de 42,6x con la excepción de una muestra con una cobertura de 3,57x. Esta muestra se descartó para los análisis posteriores. Una vez se descarta esta muestra, las restantes presentan una eficiencia de mapeo de entre 90-98%, con la excepción de una muestra (con una eficiencia de mapeo de 75,4x).

De las 195.238 regiones exónicas del genoma humano, solamente 23.021 (11,21% del exoma total) no han sido alineadas en ninguna muestra.

Se utilizó VarSeq™ y Alamut para realizar el filtrado de las variantes genéticas candidatas a jugar un papel conductor en el carcinoma escamoso de ano. Así, tras analizar todas las variantes con impacto alto sobre la proteína, se encontró un total de 333 variantes sobre 312 genes en los 45 pacientes considerados para el análisis. La totalidad de los genes con variantes de alto impacto en esta patología están reflejados en la tabla 7. El número de casos y las frecuencias de los dieciséis genes que presentaron variantes de alto impacto de forma recurrente están descritas en la tabla 8 y tabla 9. La figura 16 muestra la distribución y clasificación de estas variantes recurrentes.

FBXW7	AQR	COQ5	FGFBP1	LILRA1	PA2G4	RPS6KA6	TDRD15
CLTC	ARHGAP45	CPN1	FITM1	LRP2	PCDHB1 4	RPS6KC1	TEP1
NEXN	ARID1A	CPNE3	FRRS1	MAP3K1	PDCD5	RTN3	TEX11
ZNF750	ARID1B	CREB3L1	FRY	MAP4K4	PDE4A	RYSR2	TEX15
ARHGAP21	ARID5B	CREB5	FUNDC2	MAPK3	PDIA3	RYSR3	TMEM38B
CNOT7	ARPC1A	CSDC2	GALNT5	MARCH6	PDZK1	SCAF4	TMIGD1
COG1	ASB10	CT83	GALNT7	MARCH7	PEAK1	SCFD2	TMX2
FAT1	ATP6V0E1	CTH	GCDH	MATR3	PGBD1	SCGN	TRHDE
KIAA0753	BAIAP2	CTNNA2	GCLC	MEDAG	PHF3	SCIN	TRIP12
KMT2C	BBOF1	CYP2R1	GIMAP4	MIS18BP1	PHTF1	SCN3A	TTC21A
KMT2D	BBS7	DCHS2	GLMN	MKNK1	PI4KB	SCNM1	TXLNG
NSD1	BCORL1	DDX58	GLS2	MLPH	PIK3R6	SCUBE2	TYROBP
RHBG	BOC	DEFB135	GNMT, PEX6	MPDU1	PKD2L1	SEPT10	U2AF2
SRRM3	BTNL3	DGKI	GNPAT	MPHOSPH 8	PLCB4	SGO2	UBR4
SYNE2	C1orf210	DIAPH2	GPAT4	MPO	PLOD3	SH2D4B	UBR5
TRAF3IP1	C20orf194	DIEXF	GPRC5A	MPP1	PODN	SHANK1	UNC80
RBM43	C2CD3	DLG5	GPSM2	MRM3	PPWD1	SLC13A2	USH1C
A2M	C8B	DLX4	GPT	MRPL40	PREX2	SLC40A1	USP12
ABCA10	CACNA1G	DNAH10	GSDMA	MTERF3	PRKAG2	SLC9A7	VWA5B1
ABCC9	CCDC121	DNAH7	H2BFM	MYBPC1	PRKCD	SMURF1	VWDE
ACOXL	CCDC180	DNMT1	HELZ	MYH11	PRKCE	SNX18	WASF1
ACSM2A	CCDC82	DNPEP	HHAT	MYL6B	PRKD1	SNX29	WBSCR2 8
ACTR3	CCL5	DST	HIGD1B	MYO18B	PROK2	SNX32	YKT6
ADAM11	CCNA1	DZIP3	HIPK3	MYOF	PROX1	SORBS1	ZCWPW2
ADAM20	CD177	EGR4	HK3	NCOA2	PRR14	SORCS1	ZFP69B
ADCY4	CD5	EIF6	HLCS	NCOR1	PTEN	SPATA20	ZFYVE16
AGL	CDC37L1	ELF1	IGSF10	NDUFV1	PTPN14	SPATA31E1	ZFYVE26
AIM1	CDH7	EPHA2	IKBKB	NEB	PUM2	ST6GALNAC 3	ZNF200
AK5	CEP192	EPHA5	KIAA0430	NLRP11	RAB40AL	STAC2	ZNF546
ALDH3B1	CFAP157	ESYT3	KIAA1217	NOP2	RAD54L2	SULT4A1	ZNF573
ALDH4A1	CFAP70	ETNPPL	KIAA1429	NOS2	RARG	SUN5	ZNF577
ANKHD1	CFL2	EXT2	KNTC1	NPAS2	RBM48	SYK	ZNF615
ANKHD1- EIF4EBP3	CHD1L	FAHD1	KPNA3	NPHP1	RBMS3	SYNRG	ZNF630- AS1
ANKLE2	CHD7	FAHD2B	L2HGDH	NSD2	RBPJ	SYT15	ZNF716
ANKRD6	CIT	FAM134B	LAMB1	NUTM1	RCC2	TAS1R3	ZNF746
ANO3	CLCA4	FAM227B	LAMB2	OIT3	RDH12	TAS2R41	ZNF781
ANO4	CMYA5	FAM98B	LARGE1	OR10W1	RGS22	TAS2R50	ZP2
ANPEP	CNKS3R3	FANCL	LDOC1L	OR1S1	RHBDD1	TBC1D31	ZPBP2
APEH	COBL	FGD6	LHPP	OR5K1	RLN1	TBX15	ZZZ3

Tabla 7. Genes portadores de variantes de alto impacto

Gen	Nº variantes (%)
FBXW7	4 (9%)
CLTC	3 (7%)
NEXN	3 (7%)
ZNF750	3 (7%)
ARHGAP21	2 (4%)
CNOT7	2 (4%)
COG1	2 (4%)
FAT1	2 (4%)
KIAA0753	2 (4%)
KMT2C	2 (4%)
KMT2D	2 (4%)
NSD1	2 (4%)
RHBG	2 (4%)
SRRM3	2 (4%)
SYNE2	2 (4%)
TRAF3IP1	2 (4%)

Tabla 8. Número y frecuencia de genes recurrentemente afectados (≥ 2) por variantes de alto impacto

Gen	Localización cromosómica	Variantes genéticas
FBXW7	4	chr4_153247289_G/- chr4_153247289_G/A chr4_153247289_G/C chr4_153247162_A/T
CLTC	17	chr17_57743859_G/- chr17_57760140_C/T
NEXN	1	chr17_57758839_G/A chr1_78392479_C/T chr1_78407759_CA/-
ZNF750	17	chr1_78390900_G/T chr17_80788075_C/T chr17_80789802_C/A chr17_80789503_G/C

Tabla 9. Variantes de alto impacto sobre los genes alterados en 3 o más pacientes

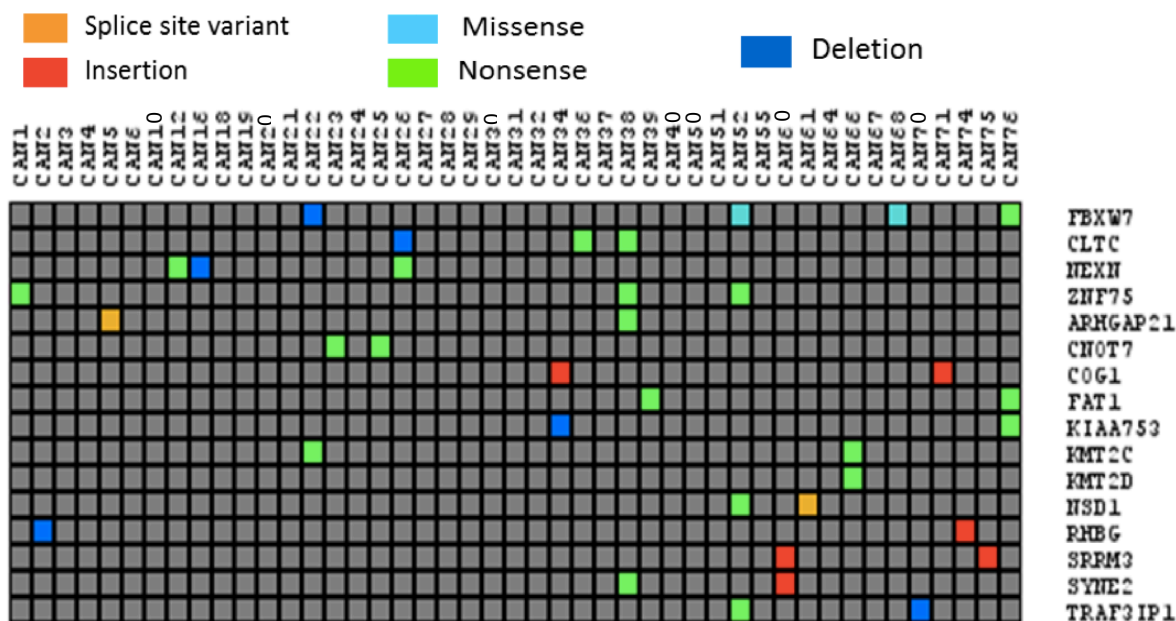


Figura 16. Mapa de las variantes genéticas de alto impacto en genes recurrentes (≥ 2) identificadas por VarSeq™ y Alamut.

El tipo de alteración más frecuentemente encontrada fue la sustitución sin sentido, con una alteración en el marco de lectura por un codón de parada prematuro. La tabla 10 describe la frecuencia de tipos de variantes detectadas por VarSeq™ y Alamut.

A pesar de la selección previa de variantes de alto impacto, Alamut reclasificó tres variantes correspondientes a sustituciones *missense*.

Tipo de variante	Número	Frecuencia
Inserción con cambio de marco de lectura (<i>frameshift</i>)	48	14%
Deleción con cambio de marco de lectura (<i>frameshift</i>)	53	16%
Sustitución sin sentido (<i>nonsense</i>)	203	61%
Sustitución con cambio de sentido (<i>missense</i>)	3	1%
Sustitución en sitio de empalme (<i>splice site variant</i>)	19	6%
Deleción intrónica	2	1%
Sustitución intrónica	2	1%

Tabla 10. Tipo de variantes detectadas por el análisis de VarSeq™ y Alamut

5.3 Procesos biológicos y vías de señalización

Para conocer los procesos biológicos y las vías de señalización relevantes en cáncer de ano se clasificaron los 312 genes con variantes de alto impacto de acuerdo a la base de datos PANTHER.

5.3.1 Procesos biológicos

De los 312 genes, 308 fueron reconocidos por PANTHER para establecer los procesos biológicos.

La figura 17 y la figura 18 muestran los procesos biológicos en los que intervienen los genes afectados de variantes de alto impacto y los genes recurrentemente afectados, respectivamente, que muestran proporciones similares para los diferentes procesos biológicos.

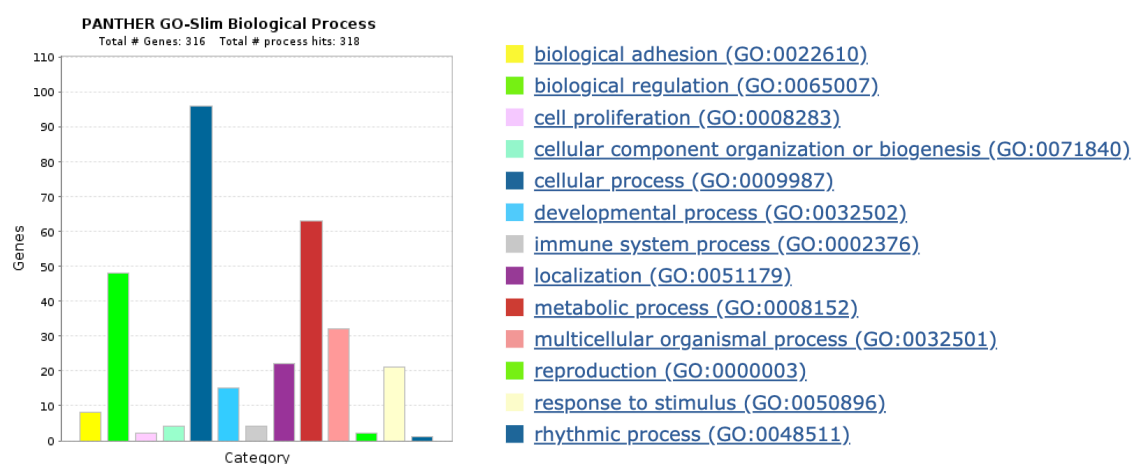


Figura 17. Procesos biológicos afectados por los genes con variantes de alto impacto

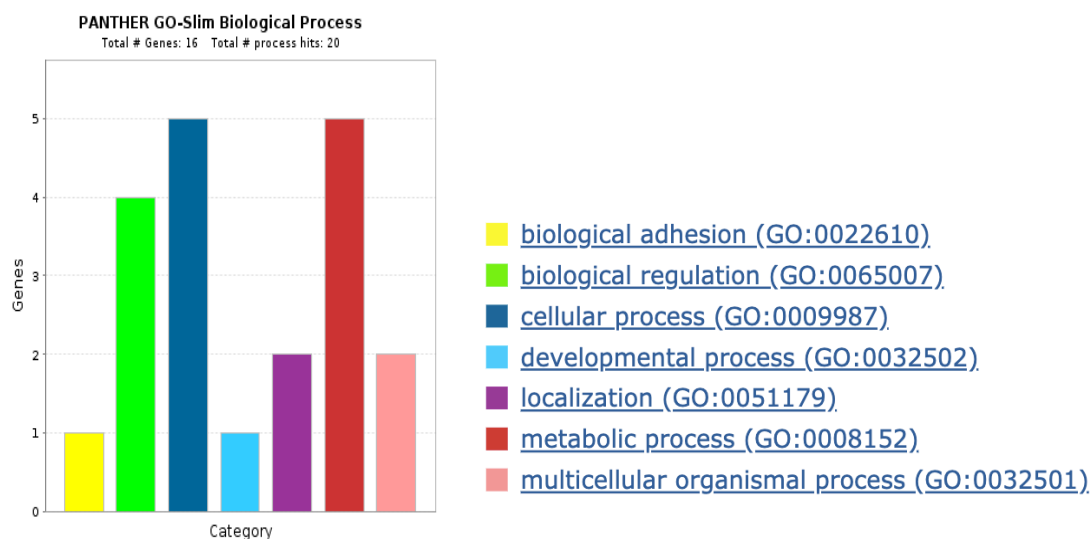


Figura 18. Procesos biológicos afectados por los genes recurrentes con variantes de alto impacto

5.3.2 Vías de señalización

Cada paciente presentó una lista única de variantes genéticas. De los 312 genes afectados por variantes descritos en este estudio, solamente 61 están identificados en las vías de señalización de la base de datos PANTHER. A partir de estos 61 genes se elaboró el gráfico de las vías de señalización afectas en carcinoma epidermoide de ano (figura 19, figura 20 y figura 21).

■ 5-Hydroxytryptamine degradation (P04372)
 ■ 5HT2 type receptor mediated signaling pathway (P04374)
 ■ Alpha adrenergic receptor signaling pathway (P00002)
 ■ Alzheimer disease-amyloid secretase pathway (P00003)
 ■ Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)
 ■ Angiogenesis (P00005)
 ■ Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin (P05911)
 ■ Apoptosis signaling pathway (P00006)
 ■ B cell activation (P00010)
 ■ Beta1 adrenergic receptor signaling pathway (P04377)
 ■ Beta2 adrenergic receptor signaling pathway (P04378)
 ■ Blood coagulation (P00011)
 ■ CCKR signaling map (P06959)
 ■ Cadherin signaling pathway (P00012)
 ■ Cytoskeletal regulation by Rho GTPase (P00016)
 ■ De novo purine biosynthesis (P02738)
 ■ EGF receptor signaling pathway (P00018)
 ■ Endogenous cannabinoid signaling (P05730)
 ■ Endothelin signaling pathway (P00019)
 ■ FAS signaling pathway (P00020)
 ■ FGF signaling pathway (P00021)
 ■ GABA-B receptor II signaling (P05731)
 ■ Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway (P06664)
 ■ Hedgehog signaling pathway (P00025)
 ■ Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway (P00026)
 ■ Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway (P00027)
 ■ Histamine H1 receptor mediated signaling pathway (P04385)
 ■ Huntington disease (P00029)
 ■ Hypoxia response via HIF activation (P00030)
 ■ Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)
 ■ Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade (P00032)
 ■ Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade (P00033)
 ■ Integrin signalling pathway (P00034)
 ■ Interferon-gamma signaling pathway (P00035)
 ■ Interleukin signaling pathway (P00036)
 ■ Ionotropic glutamate receptor pathway (P00037)
 ■ Metabotropic glutamate receptor group I pathway (P00041)
 ■ Methionine biosynthesis (P02753)
 ■ Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway (P00042)
 ■ Nicotine pharmacodynamics pathway (P06587)
 ■ Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway (P00044)
 ■ Notch signaling pathway (P00045)
 ■ Ornithine degradation (P02758)
 ■ Oxidative stress response (P00046)
 ■ Oxytocin receptor mediated signaling pathway (P04391)
 ■ PDGF signaling pathway (P00047)
 ■ PI3 kinase pathway (P00048)
 ■ Parkinson disease (P00049)
 ■ Ras Pathway (P04393)
 ■ Synaptic vesicle trafficking (P05734)
 ■ T cell activation (P00053)
 ■ TGF-beta signaling pathway (P00052)
 ■ Thyrotropin-releasing hormone receptor signaling pathway (P04394)
 ■ Toll receptor signaling pathway (P00054)
 ■ Transcription regulation by bZIP transcription factor (P00055)
 ■ Ubiquitin proteasome pathway (P00060)
 ■ VEGF signaling pathway (P00056)
 ■ Wnt signaling pathway (P00057)
 ■ p38 MAPK pathway (P05918)
 ■ p53 pathway feedback loops 2 (P04398)
 ■ p53 pathway (P00059)

Figura 19. Vías de señalización a las que pertenecen las variantes genéticas de alto impacto (análisis en PANTHER)

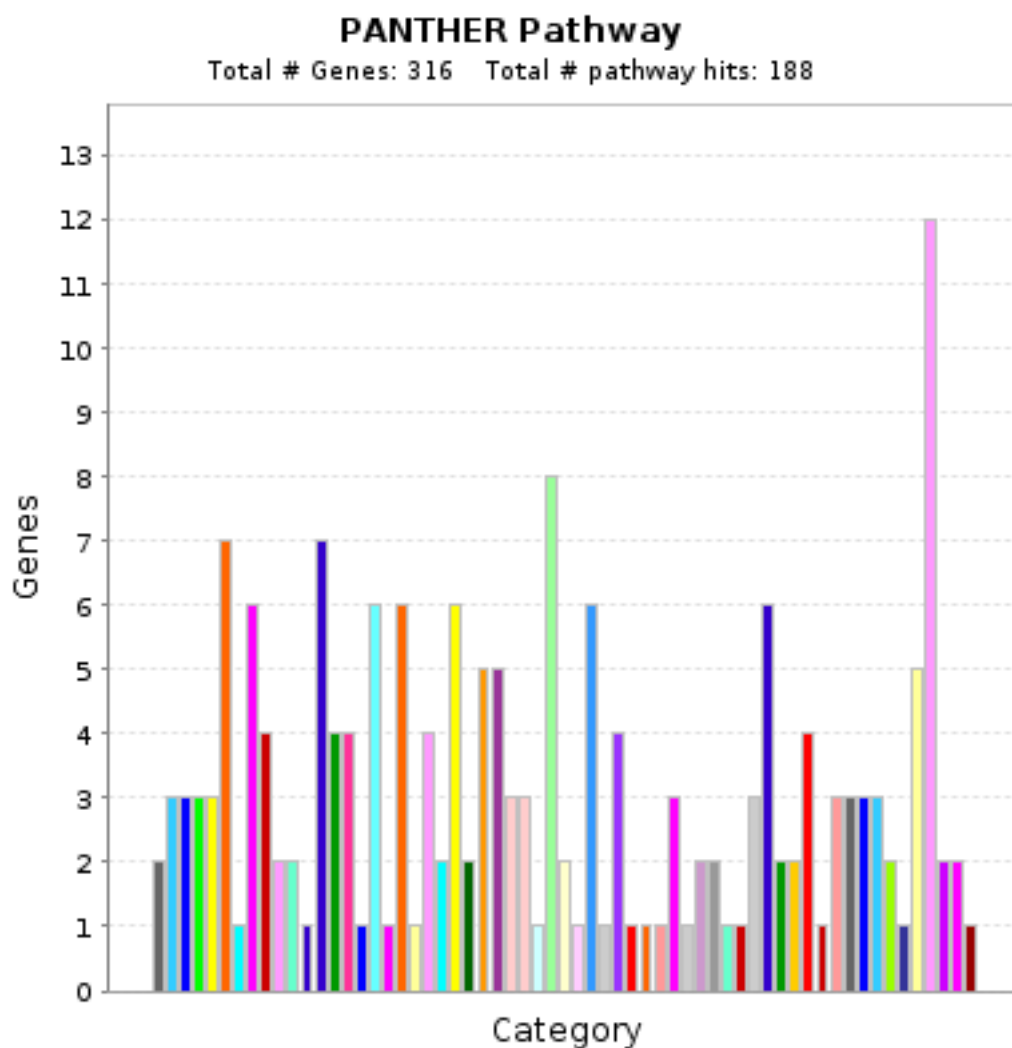


Figura 20. Vías de señalización con genes afectados por variantes de alto impacto según PANTHER

Para establecer las vías de señalización más frecuentemente afectadas se ha elaborado un gráfico representativo de las vías con 4 o más genes involucrados (figura 21), de las que destacan la vía de Wnt (12 genes), la vía de la inflamación mediada por citoquinas y quimioquinas (8 genes), la vía de la angiogénesis (7 genes), y la vía de señalización de los receptores de colecistoquinina (CCKR) (7 genes). La tabla 11 muestra los genes que presentan variantes correspondientes a las vías más frecuentemente afectadas.

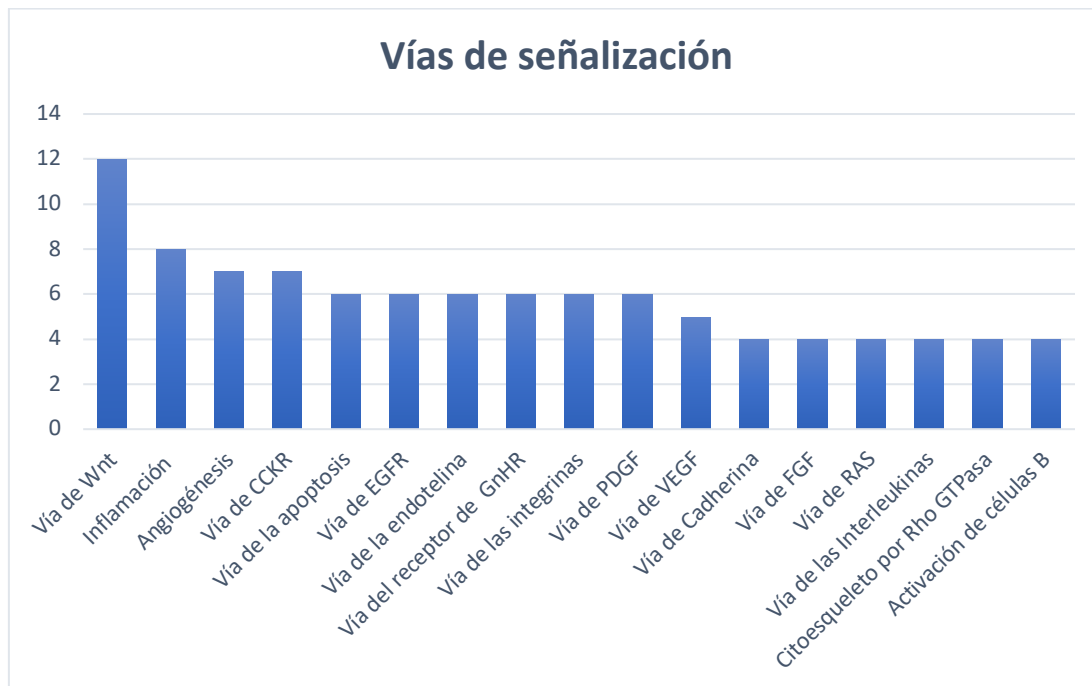


Figura 21. Vías de señalización con cuatro o más genes con variantes de alto impacto

Wnt	Inflamación	Angiogénesis	CCKR	Apoptosis	EGFR
FAT1	PLCB4	PRKCE	RYR2	IKBKB	PIK3R6
PCDHB14	ARPC1A	PRKCD	RYR3	MAPK3	PRKCD
PRKCE	CCL5	PRKD1	PTEN	MAP3K1	PRKC6
PRKCD	IKBKB	RBPJ	MAPK3	MAP4K4	PRKD1
FBXW7	MAPK3	MAPKAPK3	PRKCD	PRKCD	MAP3K1
CHD1L	MYH11	MAPK3	PRKCE	PRKCE	MAPK3
CTNNA2	PTEN	MAP3K1	PRKD1		
CDH7	PRKCE				
ARID1B					
ARID1A					
ANKRD6					
PLCB4					

Tabla 11. Genes afectados de variantes de alto impacto implicados en algunas de las vías patogénicas más frecuentes tras clasificación por PANTHER

5.4 Variantes genéticas asociadas a características clínico-patológicas

La identificación de variantes genéticas relacionadas con características clínicas se realizó a partir de los 382 genes identificados mediante VEP, que como se explica en material y métodos presentan una frecuencia de variantes superior al 10%. El anexo 1 muestra los 382 genes y su frecuencia. A pesar de que *TP53* presentó una frecuencia de variantes inferior al 10% también se evaluó su asociación con la presencia de VPH de alto riesgo, dada la potencial relevancia clínica teniendo en cuenta los datos publicados al respecto.

Aunque no se ha tenido en cuenta para la valoración de los resultados, se ha calculado el valor de la significación estadística ajustada a Bonferroni, que fue $P = (0,05/382)$; $P = 0,00013$. Si se hubiese ajustado el p-valor al test de Bonferroni, ninguna de las comparaciones exploratorias alcanzaría la significación estadística.

5.4.1 Genotipo de alto riesgo del virus del papiloma humano

La tabla 12 describe los quince genes con variantes relacionados con ausencia de VPH de alto riesgo con p-valor no ajustado inferior a 0,05, así como la OR para cada gen. La tabla 13 analiza las mismas características para *TP53* respecto a infección por VPH de alto riesgo.

Gen	p-valor no ajustado	VPH positivo (n=33)	VPH negativo (n=5)	OR (IC 95%)
ZC3H13	0,011	2/33 (6,1%)	3/5 (60%)	23,2 (2,3-250,0)
ATXN2L	0,011	2/33 (6,1%)	3/5 (60%)	23,2 (2,3-250,0)
ATRNL1	0,011	2/33 (6,1%)	3/5 (60%)	23,2 (2,3-250,0)
ASCL1	0,047	1/33 (3%)	2/5 (40%)	21,3 (1,5-333,3)
NEB	0,019	7/33 (21,2%)	4/5 (80%)	14,9 (1,4-166,6)
KAT6B	0,021	3/33 (9,1%)	3/5 (60%)	14,9 (1,7-125,0)
RANBP2	0,021	3/33 (9,1%)	3/5 (60%)	14,9 (1,7-125,0)
PHACTR4	0,021	3/33 (9,1%)	3/5 (60%)	14,9 (1,7-125,0)
DMD	0,035	4/33 (12,1%)	3/5 (60%)	10,9 (1,4-83,3)
RYR2	0,035	4/33 (12,1%)	3/5 (60%)	10,9 (1,4-83,3)
C2orf16	0,035	4/33 (12,1%)	3/5 (60%)	10,9 (1,4-83,3)
BIRC6	0,035	4/33 (12,1%)	3/5 (60%)	10,9 (1,4-83,3)
CMYA5	0,035	4/33 (12,1%)	3/5 (60%)	10,9 (1,4-83,3)
PCNT	0,035	4/33 (12,1%)	3/5 (60%)	10,9 (1,4-83,3)
SDK1	0,001	0/33 (0%)	3/5 (60%)	-

Tabla 12. Variantes genéticas diferenciales (p no ajustada $< 0,05$) para la variable infección por VPH

Gen	p-valor no ajustado	VPH positivo	VPH negativo
TP53	0,076	2/33 (6,0%)	2/5 (40%)

Tabla 13. Frecuencia de variantes sobre TP53 en función de la presencia o ausencia de VPH

5.4.2 Infección por virus de la inmunodeficiencia humana

Gen	p-valor no ajustado	VIH negativo (n=43)	VIH positivo (n=2)	OR
<i>KRAP</i> 5.10	0,021	5/43 (11,6%)	2/2 (100%)	-

Tabla 14. Variantes genéticas diferenciales (p no ajustada $< 0,05$) para la variable infección por VIH

5.4.3 Estadio según la clasificación TNM

Gen	p-valor no ajustado	Estadios I-II (n=19)	Estadios III (n=26)	OR (IC95%)
<i>ATM</i>	0,007	1/19 (5,3%)	11/26 (42,3%)	13,2 (1,5-114,3)
<i>DMD</i>	0,014	0/19 (0%)	8/26 (30,8%)	-
<i>MED1</i>	0,016	0/19 (0%)	7/26 (26,9%)	-
<i>VWF</i>	0,016	0/19 (0%)	7/26 (26,9%)	-
<i>SYNE1</i>	0,016	0/19 (0%)	7/26 (26,9%)	-
<i>CYFIP2</i>	0,032	0/19 (0%)	6/26 (23,1%)	-
<i>PAPPA2</i>	0,032	0/19 (0%)	6/26 (23,1%)	-
<i>VWA3A</i>	0,032	0/19 (0%)	6/26 (23,1%)	-
<i>FTSJ3</i>	0,032	0/19 (0%)	6/26 (23,1%)	-
<i>UTP14A</i>	0,032	0/19 (0%)	6/26 (23,1%)	-
<i>SLFN11</i>	0,032	0/19 (0%)	6/26 (23,1%)	-
<i>ARID1A</i>	0,010	5/19 (26,3%)	0/26 (0%)	-

Tabla 15. Variantes genéticas diferenciales (p no ajustada $< 0,05$) para la variable dicotomizada estadio

5.4.4 Afectación ganglionar

Gen	p-valor no ajustado	N(-) (n=19)	N(+) (n=24)	OR (IC95%)
<i>ATM</i>	0,012	1/19 (5,3%)	10/24 (41,7%)	12,8 (1,5-112,7)
<i>DMD</i>	0,012	0/19 (0%)	7/24 (29,2%)	-
<i>VWF</i>	0,027	0/19 (0%)	6/24 (25,0%)	-
<i>SYNE1</i>	0,027	0/19 (0%)	6/24 (25,0%)	-
<i>PAPPA2</i>	0,027	0/19 (0%)	6/24 (25,0%)	-
<i>ARID1A</i>	0,012	5/19 (26,3%)	0/24 (0%)	-
<i>PCNXL2</i>	0,031	4/19 (21,1%)	0/24 (0%)	-
<i>SBF1</i>	0,031	4/19 (21,1%)	0/24 (0%)	-

Tabla 16. Variantes genéticas diferenciales (p no ajustada $< 0,05$) para la variable dicotomizada afectación ganglionar

5.5 Variantes genéticas asociadas a supervivencia libre de enfermedad

La identificación de variantes relacionadas con la SLE se realizó a partir de los 382 genes con variantes identificados mediante VEP.

La presencia de variantes en cada uno de los siguientes 5 genes se asocia a peor SLE: *BRCA2*, *ZNF750*, *FAM208B*, *ZC3H13* y *ZNF599* (figura 22, figura 23, figura 24, figura 25, figura 26, tabla 17 y tabla 18).

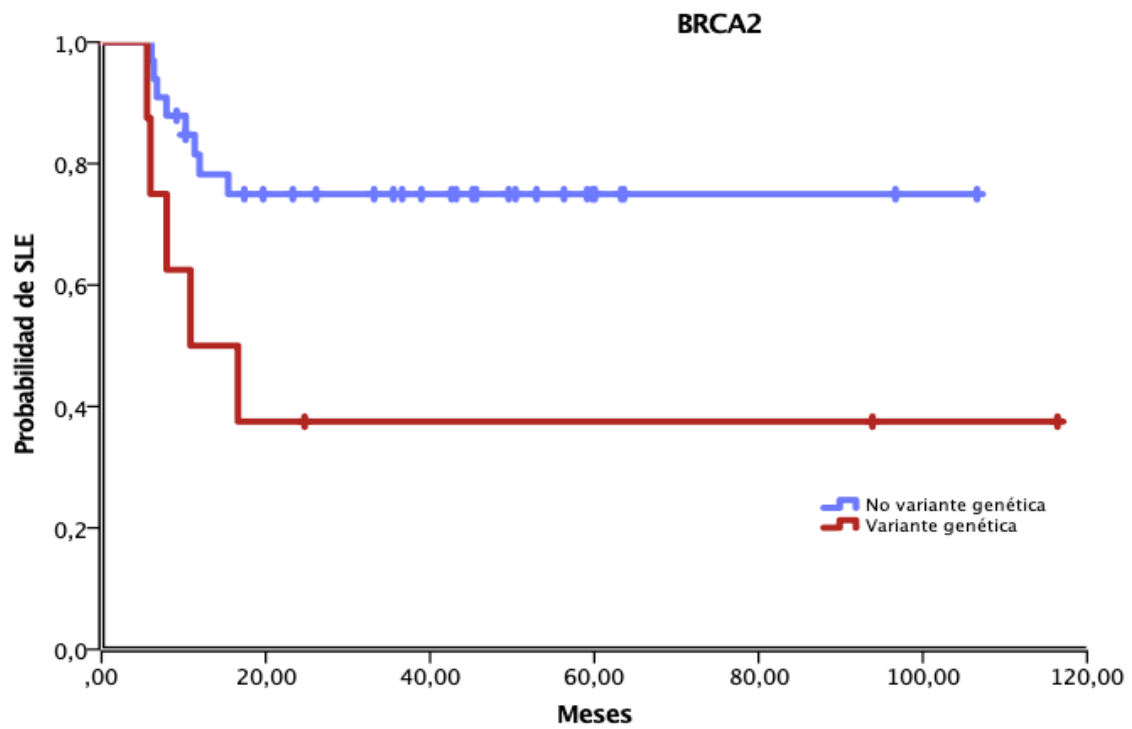


Figura 22. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de la presencia o ausencia de variantes genéticas sobre BRCA2

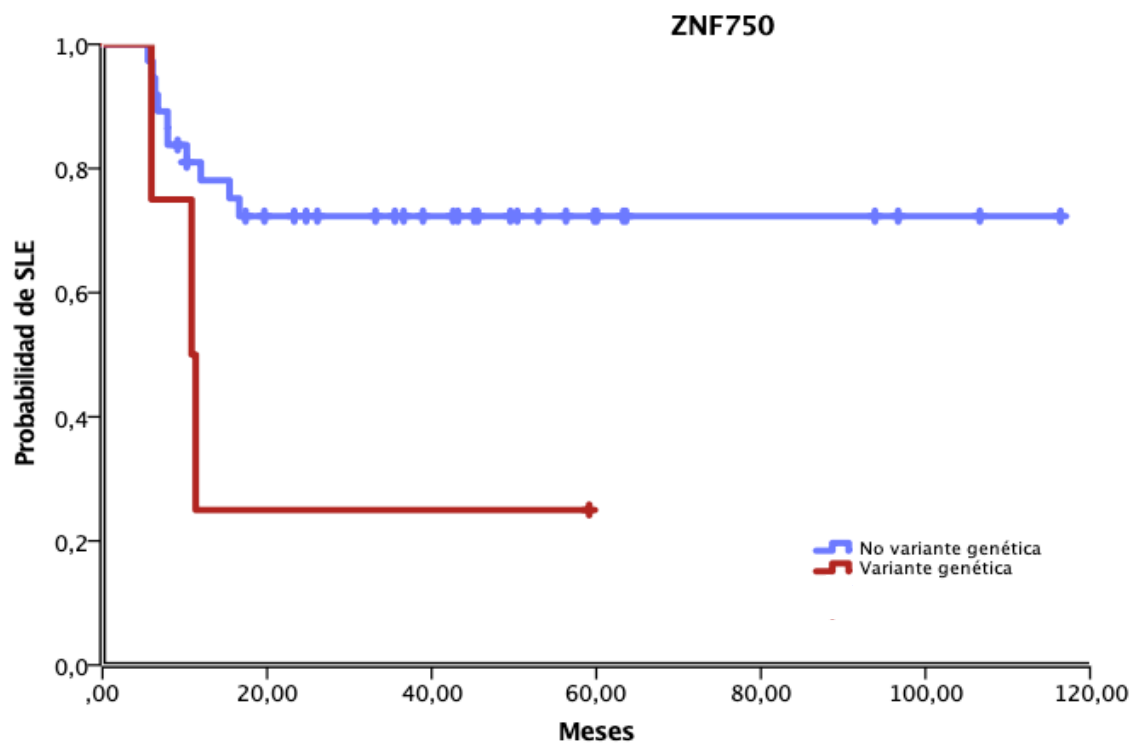


Figura 23. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de la presencia o ausencia de variantes genéticas sobre ZNF750

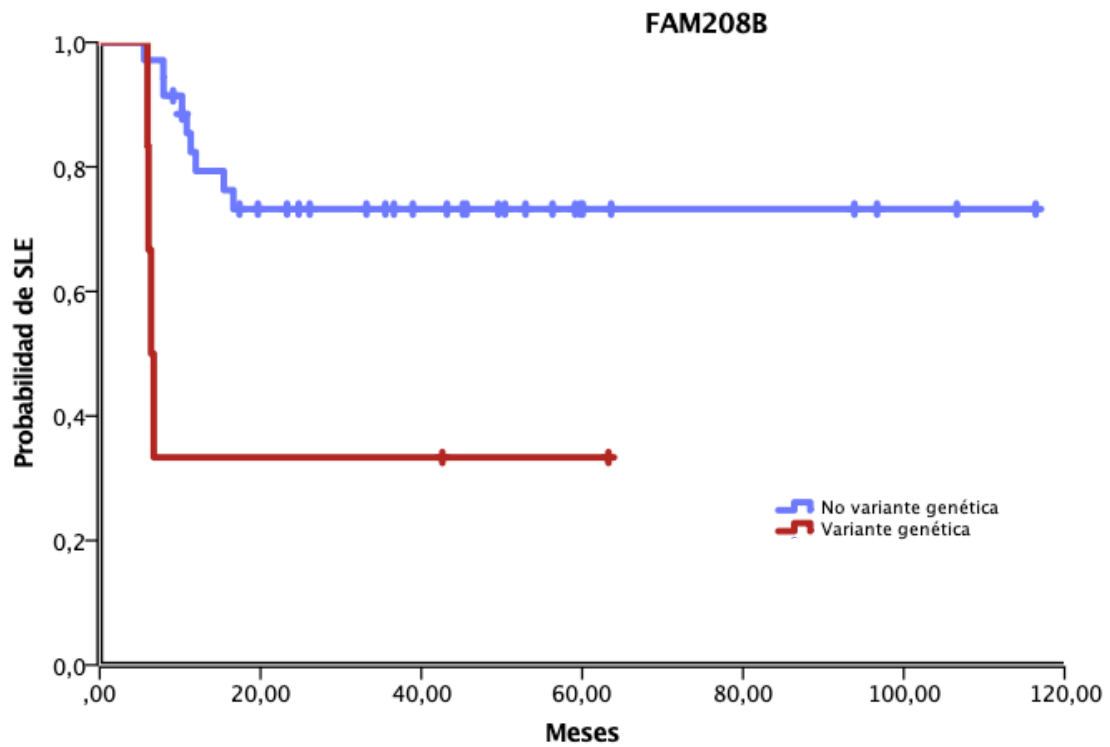


Figura 24. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de la presencia o ausencia de variantes genéticas sobre FAM208B

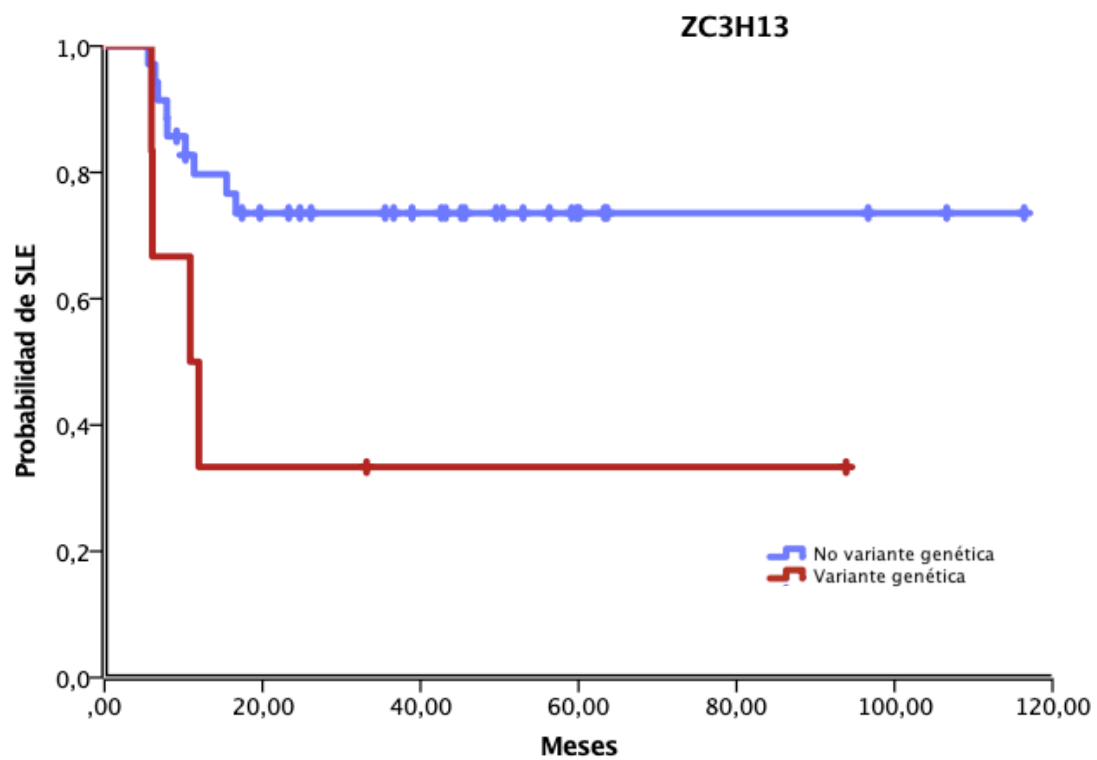


Figura 25. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de la presencia o ausencia de variantes genéticas sobre ZC3H13

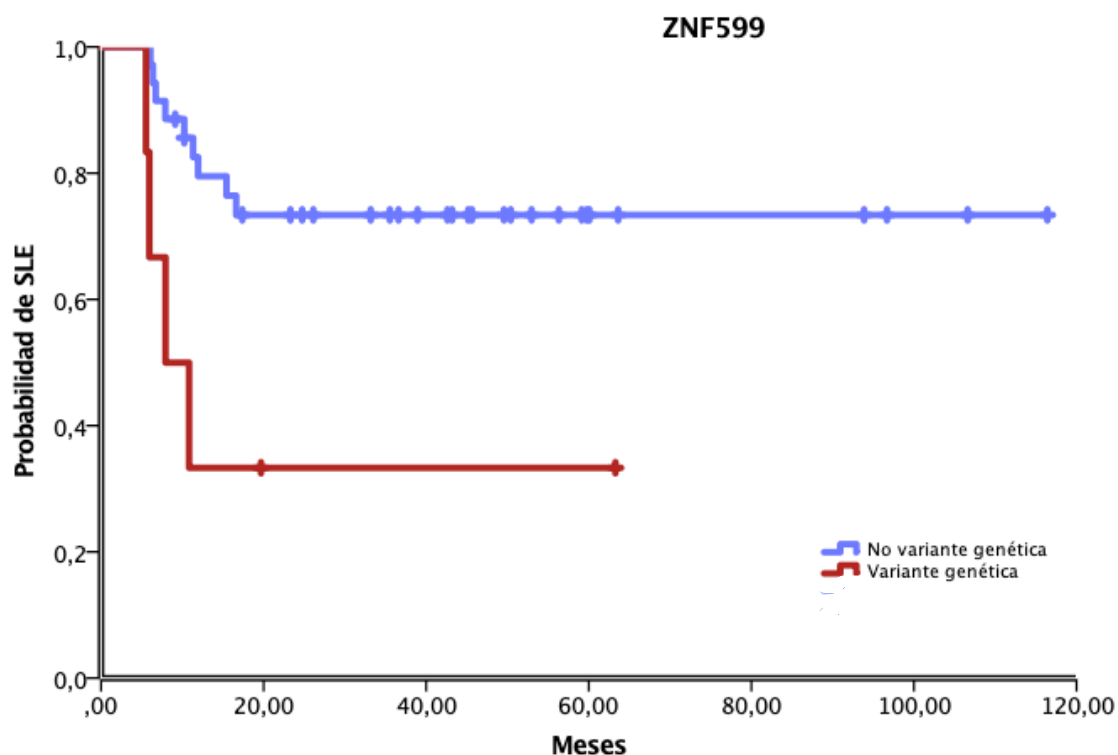


Figura 26. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de la presencia o ausencia de variantes genéticas sobre ZNF599

Gen	SLE mediana*	Tasa SLE 36 meses	HR** (IC 95%)	p-valor no ajustado
BRCA2	10,83	75% vs 37%	3,3 (1,2-24,2)	0,025
ZNF750	10,83	72% vs 25%	3,7 (1,2-78,9)	0,031
FAM208B	6,37	73% vs 33%	4,7 (2,4-115,5)	0,004
ZC3H13	10,83	74% vs 33%	3,5 (1,3-39,9)	0,026
ZNF599	7,93	73% vs 33%	4,1 (1,7-66,1)	0,011

SLE: Supervivencia libre de enfermedad. Mediana*: Correspondiente al grupo de pacientes con variantes sobre el gen. HR**: Hazard Ratio Variante: (Presencia/Ausencia)

Tabla 17. Estadísticos de los genes relacionados con SLE

Gen	Localización cromosómica	Número de muestras	Frecuencia	Variantes genéticas
<i>BRCA2</i>	13	8	18%	chr13_32914858_G/T chr13_32936775_G/A chr13_32972631_-/TAGAC chr13_32900790_G/A chr13_32936713_T/C chr13_32914516_-/G chr13_32968918_C/T chr13_32953641_A/G
<i>ZNF750</i>	17	4	9%	chr17_80788075_C/T chr17_80789547_C/- chr17_80789802_C/A chr17_80789503_G/C
<i>ZNF599</i>	19	6	13%	chr19_35249946_C/G chr19_35250950_T/A chr19_35251215_C/T chr19_35250352_C/T chr19_35260373_C/T chr19_35250567_G/T
<i>ZC3H13</i>	13	6	13%	chr13_46616368_C/- chr13_46539442_C/T chr13_46542026_CGCG/- chr13_46563072_G/A chr13_46584507_G/A chr13_46563125_C/T
<i>FAM208B</i>	10	6	13%	chr10_5784388_T/C chr10_5781712_G/A chr10_5762722_G/C chr10_5782394_C/A chr10_5789623_G/C chr10_5781667_G/C

Tabla 18. Genes con variantes asociados a peor supervivencia libre de enfermedad

DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

6.1 Planteamiento del estudio

El carcinoma epidermoide de ano es una patología de muy baja incidencia, lo que dificulta la investigación tanto clínica como traslacional. El tratamiento actual, basado en la administración concurrente de quimio-radioterapia definitiva con 5-FU y mitomicina, no se ha modificado desde la década de los 70, exceptuando las más modernas técnicas de radioterapia. De este modo, las tasas de recaída son del 30% a los 5 años, y los efectos adversos del tratamiento considerables.

Es por tanto necesario mejorar la comprensión del panorama molecular que regula la patogénesis del carcinoma escamoso de ano, con objeto de encontrar biomarcadores pronósticos, mejorar la selección de pacientes para la administración de tratamientos agresivos, identificar biomarcadores predictivos de beneficio al tratamiento y establecer nuevas dianas terapéuticas.

En este estudio se han analizado 46 muestras de carcinoma epidermoide de ano localizado en parafina, mediante secuenciación del exoma completo. El trabajo se ha enfocado desde una doble aproximación al perfil mutacional del carcinoma escamoso de ano. Por un lado, se ha realizado un análisis restrictivo, mediante VarSeq™ y Alamut para identificar las variantes de alto impacto, conductoras de esta patología. Además, con las variantes encontradas tras este análisis, a través de PANTHER, se han descrito, las vías moleculares alteradas en carcinoma escamoso de ano. Por otro lado, se ha planteado un análisis global, no enfocado exclusivamente a los genes bien conocidos en oncología. Así, se ha realizado un análisis exploratorio a partir de variantes genéticas más frecuentes, de impacto alto o moderado, con la intención de caracterizar los

diferentes grupos clínico-patológicos e identificar aquellas variantes que pudieran asociar un peor pronóstico de la enfermedad.

Aunque no existen grandes registros de esta patología, las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en este estudio son, en general, representativas y similares a los pacientes incluidos en grandes ensayos clínicos para enfermedad localizada. Sin embargo, un 60% de los pacientes recibió panitumumab además de la quimioterapia estándar al proceder de un ensayo clínico no aleatorizado, y 4 pacientes no recibieron quimio-radioterapia concurrente definitiva por condicionantes individuales. Al analizar los factores clínicos pronósticos clásicos del carcinoma epidermoide de ano, como la afectación ganglionar, el estadio TNM, el sexo, la edad y la presencia VPH de alto riesgo no se encuentran diferencias estadísticamente significativas, aunque el pequeño tamaño muestral no permite disponer de la potencia estadística adecuada para encontrar diferencias.

6.2 Variantes genéticas de alto impacto

En el análisis global de variantes de alto impacto se evidencia una muy baja frecuencia de variantes sobre numerosos genes. De hecho, cada paciente presentó una lista única de variantes. Chung *et al*, encuentran resultados similares en una muestra, a pesar de analizar un número limitado de genes seleccionados por su estrecha relación con cáncer (127). Esta dispersión de las mutaciones limita las posibilidades de búsqueda de dianas terapéuticas clínicamente relevantes en el conjunto de pacientes.

A pesar de la baja frecuencia de variantes de alto impacto, se identificaron 16 genes que sí presentaron variantes de forma recurrente. Estas variantes no se

asocian al estadio, por lo que no se puede descartar (ni confirmar) que sean eventos tempranos en la carcinogénesis del carcinoma escamoso de ano.

FBXW7 es el gen que ha presentado variantes de alto impacto con mayor recurrencia, en 4 pacientes (9%). Aunque *FBXW7* solamente se encuentra mutado en el 2,5% de las neoplasias en humanos, la frecuencia es mayor en carcinoma de cérvix (6%) (171) y en carcinoma de ano (6-19%) (127,128,130,131). Tres de las 4 mutaciones encontradas en esta serie están presentes en el *hotspot* R505, uno de los codones más frecuentemente mutado de este gen, localizado en el dominio de unión de sustratos (171). La mayoría de las mutaciones de *FBXW7* detectadas en células tumorales son sustituciones de tipo *missense*, al igual que ocurre en dos casos de nuestra serie. Es importante resaltar el valor patogénico en estos dos casos, teniendo en cuenta que, en toda la serie, únicamente se han identificado 3 mutaciones tipo *missense* tras el análisis por VarSeq™ y Alamut. A pesar de que las variantes tipo *missense* estaban excluidas del análisis de variantes de alto impacto, el *software* las reclasificó.

Este gen supresor de tumores forma parte del complejo SCF (*Skp1-Cdc53/Cullin-F-box-protein complex*), que se encarga de la degradación por ubiquinación de Notch1, c-Myc, cyclin E, Mcl-1, mTOR, y Jun (figura 27) (171).

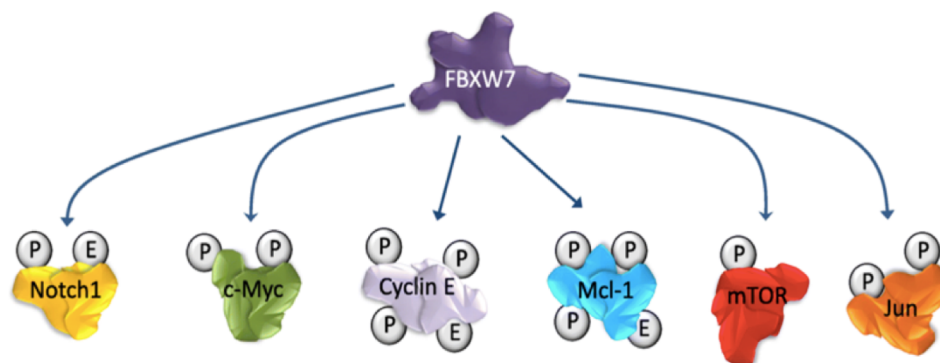


Figura 27. Sustratos de degradación de FBXW7. Imagen Modificada de Yeh CH et al (171)

La pérdida de función de FBXW7 deja abierta la puerta a varias vías oncogénicas y a posibles marcadores predictivos de respuesta a diferentes dianas terapéuticas. Por ejemplo, el incremento en la expresión de mTOR en líneas celulares con mutación de *FBXW7* aumenta la sensibilidad a rapamicina (172). Las mutaciones en *FBXW7* se han asociado a resistencia a anti-EGFR y oxaliplatino (173,174) en pacientes con cáncer de colon y a resistencia a cisplatino en cáncer gástrico (175). Asimismo, la desregulación negativa de FBXW7 se asocia a resistencia de inhibidores de EGFR en cáncer de pulmón (176). Todos estos fármacos tienen una potencial utilidad en el tratamiento del carcinoma escamoso de ano.

Un mecanismo redundante que podría afectar a la disfunción de FBXW7 sin la necesidad de mutación proviene de la inactivación de p53, ya sea por mutación propia o por su degradación secundaria a la oncoproteína viral E6. En condiciones normales, FBXW7 es una diana activada por p53 (177). En otras neoplasias se ha descrito el papel sinérgico del silenciamiento génico de FBXW7

promovido por la mutación en *TP53* en la adquisición del fenotipo maligno y progresión (178,179).

ZNF750 es otro de los genes con mayor frecuencia de variantes de alto impacto encontrado en este trabajo, aunque no se había descrito previamente en carcinoma escamoso de ano. Las mutaciones sobre *ZNF750* y su pérdida de expresión se han asociado recientemente a carcinomas de extirpe epidermoide (180) así como a peor pronóstico y menor quimio-radiosensibilidad, tanto en tumores epidermoides de esófago como de la región ORL (181–183). Por otro lado, se ha relacionado directamente con el VPH en carcinoma oral (184). Se trata de un gen supresor de tumores cuyo mecanismo oncogénico no está resuelto, aunque se ha descrito que permite la diferenciación de células epidérmicas, suprime la migración celular y modula el microambiente vascular para inhibir la progresión tumoral en carcinoma escamoso oral (180,185).

Varios de los genes con variantes redundantes en esta serie codifican por enzimas modificadores de la cromatina, y están, por tanto, implicados en la regulación epigenética. Esta es una de las vías más frecuentemente afectadas en carcinoma escamoso de ano. *KMT2C*, *KMT2D* y *NSD1* pertenecen concretamente al grupo de histona-lisina N-metil transferasa, que permiten la metilación de histonas. En función del sitio de metilación de las histonas actuarán como activadores o represores de la transcripción. Tanto *KMT2D* como *KMT2C* actúan sobre K4H3 (186). En este caso, la metilación sobre la lisina K4 de la histona H3 da lugar a una activación de la transcripción (187). En condiciones normales, *KMT2C* participa en la activación de la expresión génica de *TP53* en respuesta al daño del ADN (188). Así, se ha descrito que el silenciamiento de

KMT2C en líneas celulares de cáncer de vejiga afecta a la transcripción de genes relacionados con la reparación del ADN, replicación del ADN, control del ciclo celular y apoptosis (189). Como consecuencia, las células con deficiencia de *KMT2D*, así como aquellas con deficiencia de *KMT2C*, presentan una elevada frecuencia de rotura de doble cadena de ADN (189,190), por lo que el tratamiento con inhibidores del PARP parece una opción diana interesante para explorar en estos tumores (189).

Las mutaciones sobre *KMT2D* y *KMT2C* han sido previamente descritas en carcinoma epidermoide de ano, con frecuencias variables, del 16-22% y 0-32% respectivamente (127,129). Además son mutaciones comunes en otras neoplasias, habiéndose descrito en meduloblastoma, feocromocitoma, linfoma, carcinoma de vejiga, pulmón, endometrio, cérvix, esófago o páncreas (186,191).

El producto proteico del gen *NSD1*, también conocido como gen *KMT3B*, permite la metilación de la histona H3 en la lisina 36 (H3K36), que a su vez activa la transcripción de eucromatina. Por tanto, la disfunción de *NSD1* lleva a un silenciamiento transcripcional (192). Sin embargo, se desconoce su mecanismo y las condiciones que regulan sus propiedades oncogénicas. Por ejemplo, en tumores de próstata, la mayor expresión de *NSD1* se asocia a metástasis, mientras que su expresión reducida se asocia a recaída bioquímica (193). Se encuentra más frecuentemente mutado en tumores de cabeza y cuello VPH (-) y fumadores, y parece conferir mejor pronóstico (194). Es necesario profundizar en los mecanismos que regulan sus propiedades oncogénicas.

CLTC presenta variantes de alto impacto en el 7% de los casos. Codifica a la proteína *CLTC*, que participa en el tráfico intracelular y en la endocitosis. Aunque

clásicamente no se ha asociado a la patogénesis del cáncer y su frecuencia mutacional de alto impacto en cáncer de acuerdo a la base de datos del ICGC es inferior, cada vez existe más evidencia de su potencial papel en procesos oncogénicos como gen supresor de tumores. Además de participar en la segregación cromosómica, juega un papel estructural en la vía Wnt, favoreciendo la unión del signalosoma LRP6 con AXIN, un regulador negativo de la vía. Por otro lado se ha descrito su capacidad para activar p53 (195). Su fusión con *ALK* conforma el oncogén *CTLC-ALK* que permite la activación de *ALK* como mecanismo patogénico en diferentes neoplasias como el tumor miofibroblástico o el linfoma anaplásico (196).

La migración y la adhesión celular son otras de las vías de señalización en las que intervienen algunos de los genes más frecuentemente afectados por variantes de alto impacto en este trabajo, como son *FAT1*, *NEXN*, *ARHGAP21*, *SYNE2* y *KIAA0753*.

FAT1 es un gen supresor de tumores que da lugar a una proteína del tipo cadherina. Esta proteína es capaz de unirse a β -catenina, antagonizando su localización nuclear, y así es capaz de bloquear la proliferación celular. Por tanto, la inactivación de *FAT1* promueve la señalización de la vía Wnt en cáncer (197). Varios tumores como el cáncer colo-rectal, glioblastoma y carcinomas de cabeza y cuello presentan mutaciones sobre *FAT1* (198). Del mismo modo, en carcinoma escamoso de ano (15%) y carcinoma de cérvix (9%) se han descrito recientemente mutaciones sobre *FAT1* (131,199). Los inhibidores de la vía Wnt como NVP-TNS656 podrían ser un tratamiento dirigido para aquellos casos que presentan mutaciones sobre *FAT1*. Por otro lado, se ha descrito que *FAT1*

permite la inactivación del oncogén *YAP1*. Así, *YAP1*, se convierte en una diana para el desarrollo de fármacos dirigidos. Aunque actualmente no existen inhibidores directos de *YAP1*, Verteporfin es un disruptivo de la interacción entre *YAP1* y el factor de transcripción *TEAD2*, que podría ser investigado en este subgrupo de pacientes (200).

NEXN es un gen escasamente estudiado relacionado con miocardiopatía. Se expresa fundamentalmente en células de músculo liso de corazón, vejiga y tejido gastrointestinal. A pesar de no tener relación con el cáncer hasta el momento, su silenciamiento, además de bloquear la polimerización de la actina, bloquea la migración celular y parece estar regulado por *YAP1* (201).

Otro de los genes que presenta variantes de alto impacto de forma recurrente y relacionado con la migración celular es *ARHGAP21* (también conocido como *ARHGAP10*). Pertenece a la familia de las RhoGAPs (*RhoGTPase activating proteins*), como inhibidores de las RhoGTPasas, que intervienen en procesos relacionados con el citoesqueleto, como son la migración, proliferación, adhesión, endocitosis y exocitosis (202,203). *ARHGAP21* actúa como gen supresor de tumores en leucemia pediátrica, cáncer de ovario, mama, estómago o pulmón (204,205). Aunque la pérdida de función de *ARHGAP21* favorece la pérdida de adhesión y la migración celular, no se conocen completamente ni el mecanismo subyacente que lo regula ni los factores que favorecen su expresión y acción (203). Además, en cáncer gástrico se ha demostrado que es capaz de activar a *p53* favoreciendo la apoptosis, así como inhibir *MTORC1* y secundariamente favorecer la autofagia (204). En carcinoma de pulmón, se ha

descrito que ARHGAP21 bloquea la vía de Wnt a través de la inhibición de beta-catenina (205).

SYNE2 codifica la proteína nesprin-2 (*nuclear envelope spectrin repeat protein-2*), encargada de mantener arquitectura y posición nuclear. Se han descrito mutaciones recurrentes sobre *SYNE2* en cáncer de mama, colo-rectal y cabeza y cuello (206). La ausencia o disminución de nesprin-2 podría aumentar la maleabilidad nuclear, permitiendo la migración celular a través de espacio de tejido estrecho (206).

KIAA0753 interviene en la duplicación del centriolo (207). Aunque no está establecido el mecanismo patogénico en cáncer, se ha descrito su posible papel en la adhesión microvascular previa al desarrollo de metástasis hepáticas en cáncer de colon (208).

Los demás genes con variantes de alto impacto funcional recurrentes en esta serie de cáncer de ano (*CNOT7*, *COG1*, *RHBG*, *SRRM3* y *TRAF3IP1*) presentan una frecuencia anecdótica en cáncer según el portal del ICGC. *CNOT7* actúa mediante su unión a una proteína antiproliferativa (B Cell translocation protein), que regula negativamente la proliferación celular. *COG1* da lugar a una de las 8 proteínas que forma el complejo localizado de Golgi (COG), requerido para la morfología y función normales del aparato de Golgi (209). *RHBG* codifica una proteína transmembrana de la familia de las Rhesus no eritroides, que se expresa principalmente en riñón, cuya función esencial es el transporte de amoníaco. También se encuentra en otros tejidos como ovario, esófago y piel. Se ha descrito que la expresión de *RHBG* está regulada directamente por beta-

catenina en líneas celulares de cáncer de colon y hepatocarcinoma (210). El papel de *SRRM3* y *TRAF3IP1* en cáncer esta pendiente de ser establecido.

En este punto conviene destacar que, tras el análisis para seleccionar variantes de alto impacto mediante VarSeq™ y Alamut, el *software* descartó las variantes tipo *missense* en su práctica totalidad por no corresponder por definición a variantes de alto impacto sino con impacto moderado. Este análisis bioinformático, más restrictivo en cuanto a las variantes de alto impacto, explica la menor o nula frecuencia de variantes en otros genes clásicamente mutados en otros estudios en carcinoma escamoso de ano, como *PIK3CA* (20-36%) (127–131). No obstante, en el análisis por VEP no limitado a variantes de alto impacto, la frecuencia de variantes sobre *PIK3CA* es del 40%, similar a estos estudios (Anexo 1).

Por otro lado, al analizar el perfil mutacional del carcinoma de cérvix, que comparte las bases etiopatogénicas con el carcinoma escamoso de ano, sucede algo similar. Entre los genes mutados significativamente, destaca *PIK3CA* (14-26%) (211,212). No obstante, al realizar el análisis de mutaciones de alto impacto funcional según el análisis del ICGC *Data Portal* (126) ya no aparece entre los 20 genes más mutados (figura 28).

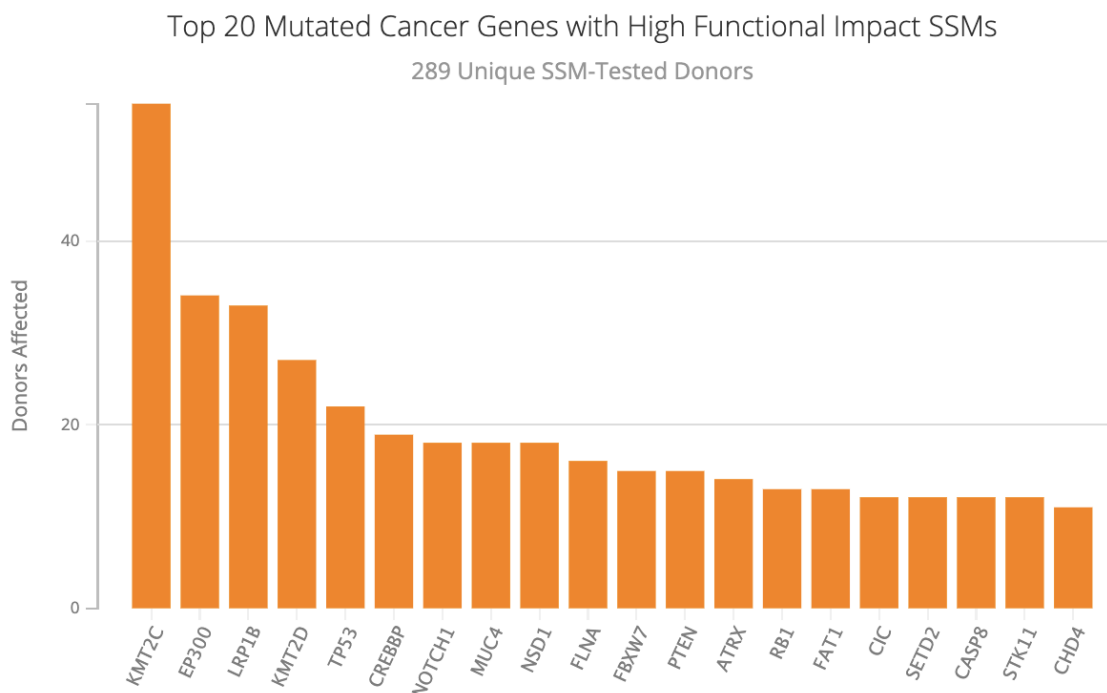


Figura 28. Mutaciones de alto impacto en cáncer de cérvix de acuerdo con el ICGC Data Portal (126)

Por otro lado, en este análisis en carcinoma de cérvix se mantienen algunos genes y emergen otros como los más frecuentemente alterados, como son *KMT2C*, *KMT2D*, *NSD1*, *FAT1* y *FBXW7*, que coinciden con los resultados de este análisis en carcinoma escamoso de ano. Estos paralelismos confirman que, en líneas generales, además de etiopatogenia, el carcinoma epidermoide de cérvix y de ano también comparten un perfil mutacional similar y permite hipotetizar que las nuevas terapias diana en carcinoma de cérvix podrían ser efectivas también en carcinoma epidermoide de ano.

6.3 Vías de señalización

Para conseguir una visión global de la biología tumoral del carcinoma escamoso de ano se realizó, con la herramienta y base de datos PANTHER, un análisis de

los procesos biológicos y de las vías de señalización en las que estaban involucrados los genes afectados por variantes de alto impacto.

Los tres procesos biológicos de nivel 1 más representados por estos genes fueron el proceso celular, el metabólico y la regulación biológica. Los 16 genes con variantes recurrentes están involucrados en los mismos procesos.

De los 312 genes afectados por variantes identificados en este estudio, 61 están incluidos dentro de las vías de señalización de la base de datos de PANTHER. A pesar de que, como se ha discutido previamente, cada paciente presentó una lista única de variantes genéticas, y de que se han descrito múltiples variantes de genes en muy baja frecuencia, los genes alterados identificados se concentran en un grupo de vías comunes relacionadas con el desarrollo del cáncer y la progresión tumoral. Entre ellas destacan la vía de señalización de Wnt, la vía de señalización de la inflamación mediada por quimioquinas y citoquinas, la vía de la angiogénesis, la vía de señalización de la apoptosis y la vía de señalización de CCKR. Otras vías como la del receptor del factor de crecimiento epidérmico, de las cadherinas, de las integrinas o del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) también son relevantes por la frecuencia de genes afectados.

Estas vías de señalización engloban la mayoría de las 10 características o *hallmarks* del cáncer, definidas como las capacidades funcionales adquiridas que permiten a la célula cancerosa sobrevivir, proliferar y diseminarse (213). Las propiedades del cáncer, descritas en el año 2000 y actualizadas en 2011 por Hanahan y Weinberg, se complementan para permitir finalmente el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis (213,214) (figura 29 y figura 30).

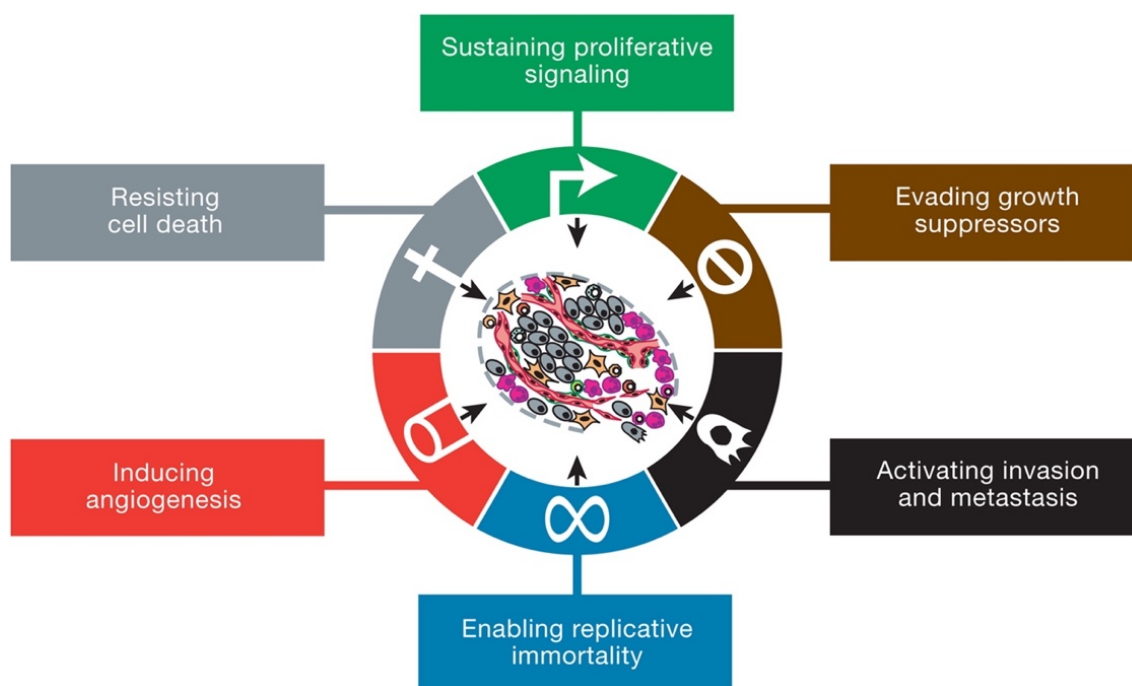


Figura 29. Hallmarks del cáncer originalmente propuestas en el año 2000 ⁴.

A continuación, se hace un análisis general de las principales vías implicadas en carcinoma epidermoide de ano según las variantes de alto impacto encontradas en este estudio, su relación con los *hallmarks* del cáncer y, en algunos casos se hace referencia a posibles tratamientos utilizados en esta vía. Evidentemente, del hecho de que un gen con variantes de alto impacto esté implicado en una vía de señalización, y que existan dianas terapéuticas implicadas en esa vía, no se puede concluir que esos fármacos sean eficaces en carcinoma escamoso de ano, puesto que el mecanismo exacto por el que funciona cada molécula se ve afectado por multitud de alteraciones genómicas, entre otras.

⁴ Imagen reproducida de Hanahan D, Weinberg RA, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74. Copyright © (2011), con permiso de Elsevier.

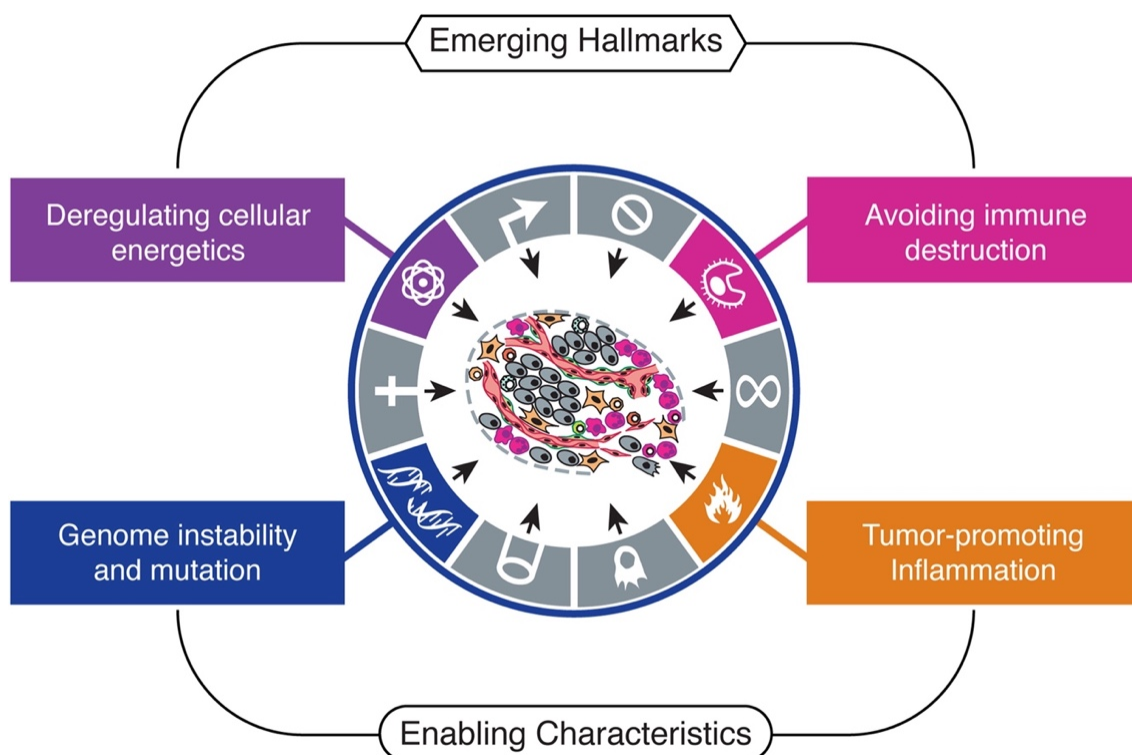


Figura 30. Hallmarks emergentes del cáncer propuestos en 2011⁵.

El *hallmark* de la evasión de genes supresores de tumores no se puede atribuir a ninguna vía de señalización en concreto, pero muchos de los genes que presentan variantes de alto impacto de forma recurrente son supresores de tumores, como *FBXW7*, *ZNF750*, *KMT2C*, *KMT2D*, *FAT1*, *ARHGAP21* o *SYNE2*. Justamente, la presencia de mutaciones sobre los dos paradigmas de gen supresor de tumores, *TP53* y *pRB*, están ausentes en el análisis de variantes de alto impacto, y son excepcionales mediante el análisis menos restrictivo no limitado a variantes de alto impacto. Conviene recordar que en carcinoma escamoso de ano VPH (+), la disfunción de p53 y pRB es la base de su

⁵ Imagen reproducida de Hanahan D, Weinberg RA, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74. Copyright © (2011), con permiso de Elsevier.

patogénesis, pero que habitualmente proviene de la degradación por las oncoproteínas E6 y E7 respectivamente.

La vía de la señalización de la inflamación es una de las más representadas por alteraciones genéticas en este trabajo. La inflamación se ha asociado clásicamente con el desarrollo del cáncer, existiendo una compleja relación entre las células inmunológicas, las células cancerosas y la inflamación. Inicialmente, existe una fase de no tolerancia de las células inmunes hacia las células tumorales, sin embargo, la persistencia de inflamación en el microambiente tumoral y la reducción de la inmunogenicidad tumoral favorece el desequilibrio y tolerancia de las células inmunológicas hacia las células tumorales (215,216). En neoplasias asociadas a infecciones persistentes como el hepatocarcinoma con el virus de la hepatitis C, o el carcinoma de cérvix con el virus del papiloma, la inflamación favorece el desarrollo tumoral (217,218). En carcinoma de ano, el VPH también suprime la inflamación aguda y el reconocimiento inmune, favoreciendo la inflamación crónica fundamentalmente mediada por IL6 (219). De este modo, la vía de señalización de la inflamación abarca directamente dos características del cáncer como son la inflamación promovida por el tumor y la evasión de la destrucción inmune. Sin embargo, la activación de esta vía contribuye a muchas de las otras propiedades del cáncer, favoreciendo la señalización de proliferación celular, angiogénesis, invasión y metástasis y la inmortalidad celular, entre otras.

Los inhibidores del punto de control inmunitario son la punta de lanza en la investigación de nuevos tratamientos en carcinoma epidermoide de ano. El estudio ECOG 2165 es un ensayo clínico fase II aleatorizado que está evaluando

la adición de nivolumab durante 6 meses tras quimio-radioterapia convencional en pacientes con carcinoma epidermoide de ano localizado de alto riesgo (220). Otros estudios ya finalizados han demostrado que los inhibidores del punto de control inmunitario son eficaces en esta patología. Por ejemplo, nivolumab ha demostrado una tasa de respuestas de 24% en 37 pacientes con enfermedad refractaria (145), mientras que con pembrolizumab se obtuvo un 17% de respuestas también sobre una muestra de pacientes con enfermedad metastásica (146). Además, se están evaluando otras estrategias más sofisticadas, como la combinación de un anti-PD1 (nivolumab) con anticuerpos contra el receptor CTLA-4 (ipilimumab), o la combinación de atezolizumab con bevacizumab (220).

Otros fármacos potencialmente eficaces, dirigidos a la vía de la señalización de la inflamación mediante el bloqueo de la promoción tumoral de la inflamación, no han sido estudiados en carcinoma epidermoide de ano. Los antagonistas de IL-1R como anakinra, o los anticuerpos monoclonales contra IL-6 como el Siltuximab, están siendo evaluados en otras neoplasias (221,222). Los AINES podrían jugar un papel de protección en carcinoma in situ de cérvix, bloqueando la progresión de la enfermedad, aunque por el momento no existen datos convincentes (223).

La vía de la apoptosis es otra de las más afectadas en este trabajo, y está directamente relacionada con dos propiedades fundamentales del cáncer: la resistencia a la muerte celular y la promoción de la inmortalidad replicativa. En la célula cancerosa existen múltiples señales que deberían activar la vía de la muerte celular como el elevado daño del ADN secundario a la hiperproliferación

celular o la hiperactivación de la señalización oncogénica (213). Sin embargo, estas células también disponen de múltiples mecanismos que bloquean la apoptosis, muchos de ellos relacionados con *TP53*. Como ya se ha descrito previamente, no se han encontrado variantes sobre *TP53* mediante el análisis de alto impacto en las 45 muestras, aunque sí se encontraron 4 tumores (9%) con variantes de impacto moderado en *TP53*. La literatura refleja una frecuencia de mutaciones sobre *TP53* variable entre el 4,7% y el 28% en carcinoma epidermoide de ano (127–130). En este estudio sí se han descrito variantes de alto impacto sobre *KTM2C* que, en condiciones fisiológicas activa la transcripción de *TP53* mediante la metilación de histonas. Además, en los casos asociados a infección por VPH de alto riesgo, el mecanismo prototipo de inactivación de p53 se debe a la degradación de p53 por E6. Morris *et al*, también describen alteraciones sobre la vía de la reparación del ADN, en una serie de pacientes con carcinoma epidermoide de ano metastásico (129).

También se han identificado variantes de alto impacto sobre 7 de los genes que intervienen en la vía de la angiogénesis. Su papel en cáncer se fundamenta en satisfacer las mayores necesidades de nutrientes y oxigenación del tumor así como eliminar los productos de deshecho y el dióxido de carbono derivados del metabolismo tumoral (213). Aunque a nivel mutacional no se han descrito grandes alteraciones en esta vía, la angiogénesis es un evento precoz en la patogénesis del carcinoma escamoso de ano. Existe un progresivo incremento en la densidad de microvasos en carcinoma infiltrante respecto al carcinoma in situ de alto y de bajo grado (224), y lo mismo ocurre en el carcinoma de cérvix. Un mecanismo planteado para justificar estos hallazgos sería la sobre-regulación de VEGF mediada por la oncoproteína viral E6 (225,226). Por otro lado, la prueba

de concepto de que los fármacos antiangiogénicos como bevacizumab o pazopanib funcionan en carcinoma de cérvix avanzado pretratado se demostró con tasas de respuesta en torno al 10% en ensayos clínicos de pequeño tamaño muestral (227,228). Posteriormente, el ensayo clínico aleatorizado fase III GOG 240 ha confirmado el beneficio en SG de bevacizumab en combinación con quimioterapia para primera línea de carcinoma de cérvix (229). En carcinoma de ano no hay resultados de ensayos clínicos con antiangiogénicos, aunque actualmente está en marcha un ensayo clínico que combina atezolizumab y bevacizumab (NCT03074513) en múltiples neoplasias entre las que se incluyen los carcinomas epidermoides de ano asociados a VPH(+).

La vía de señalización de Wnt es la más representada en carcinoma escamoso de ano en este trabajo, con 12 genes afectados por variantes de alto impacto en las 45 muestras analizadas. La vía de señalización de Wnt, juega un papel esencial en la iniciación y mantenimiento de múltiples neoplasias. La vía canónica de Wnt se activa por la unión del ligando extracelular Wnt al receptor Frizzled, que bloquea la degradación de β -catenina, incrementando su concentración en el plasma y favoreciendo el paso al núcleo celular para unirse a varias moléculas reguladoras transcripcionales que favorecen la transcripción de los genes diana de Wnt (figura 31) (230). Además, existen otras dos vías no canónicas de Wnt, la vía de la polaridad de la célula planar y la vía dependiente del calcio.

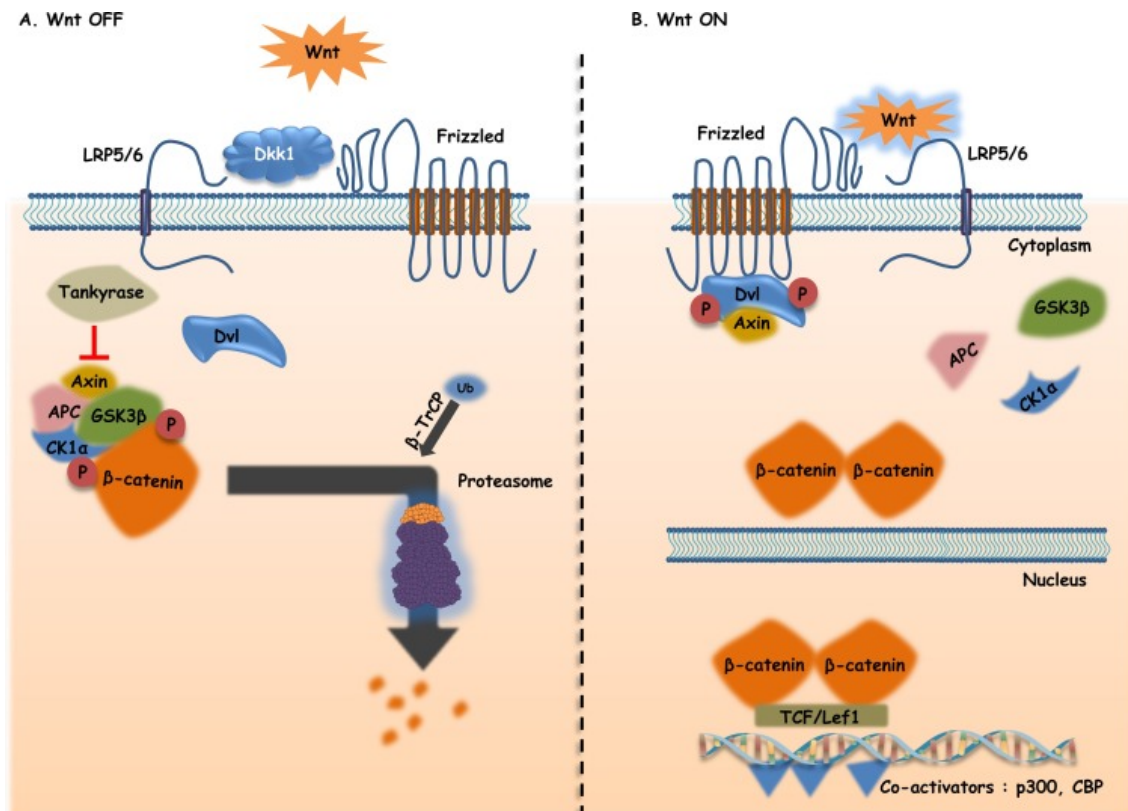


Figura 31. Vía de señalización canónica de Wnt. En ausencia de Wnt, β -catenina es degradada por el proteasoma en el citoplasma. En presencia de Wnt, β -catenina no se degrada, traslocándose al núcleo y permitiendo la transcripción de genes diana de Wnt⁶.

En cáncer de ano, se han comunicado mutaciones sobre genes pertenecientes a la vía de Wnt de forma puntual, como *FAM123B* y *FAT1* en series de pequeño tamaño muestral (129,131), algo que podría estar en relación al escaso número de estudios moleculares realizados en esta neoplasia. En carcinoma de cérvix sí se ha demostrado el papel patogénico de la vía de Wnt, fundamentalmente en relación a la infección por el VPH. La vía canónica de Wnt parece ser un paso necesario para iniciar la transformación maligna en carcinoma de cérvix y el mecanismo fundamental viene mediado por las propias oncoproteínas E6 y E7

⁶ Imagen reproducida de Duchartre Y, Kim Y-M, Kahn M. *The Wnt signaling pathway in cancer*. Crit Rev Oncol Hematol. 2016 Mar;99:141–9 (230). Copyright © (2015), con permiso de Elsevier.

que, a través del bloqueo de la degradación de β -catenina, permiten su acúmulo en el citoplasma y núcleo celular (231,232). El perfil mutacional de alto impacto funcional en carcinoma de cérvix según el ICGC también muestra alteraciones sobre algunos de los genes encontrados en este trabajo, como *FAT1*, *ARID1A*, *PLCB4* o *PCDHB14* (126).

Precisamente, la vía de Wnt juega un papel clave en la transición epitelio mesénquima, que es uno de los pilares del *hallmark* de la activación de la invasión y metástasis. Otras vías de señalización afectadas en este estudio también participan en la transición epitelio mesénquima, como son la vía de señalización de las integrinas o cadherina. De hecho, la inhibición de la expresión de E-cadherina (encargada de la adhesión celular con otras células y con la matriz extracelular) es otro sostén para el proceso de transición epitelio-mesénquima.

El *hallmark* del mantenimiento de la proliferación celular viene representado en este trabajo por varias vías. Sin embargo, la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tiene especial interés en carcinoma epidermoide de ano. La sobreexpresión de EGFR en estos tumores, junto a la ausencia de mutaciones sobre los principales genes de la vía como *NRAS*, *KRAS*, *EGFR* o *BRAF*, que confieren resistencia a los anticuerpos anti-EGFR (127–131), ha favorecido la implementación de ensayos clínicos que evalúan la eficacia de los anticuerpos monoclonales antagonistas de EGFR en carcinoma epidermoide de ano. Sin embargo, los resultados de estos estudios, que combinan radioterapia concurrente con cetuximab, cisplatino y 5-FU o con panitumumab, mitomicina y 5-FU, no han conseguido los objetivos de eficacia

deseados, además con mala tolerancia en el caso de la combinación de cisplatino y cetuximab (233,234).

La vía de los receptores de colecistoquinina es una vía frecuentemente alterada en otras neoplasias como el adenocarcinoma de páncreas, gástrico, colon o pulmón (235), pero no se ha asociado previamente a carcinoma epidermoide de ano ni de cérvix.

Este análisis se ha hecho con las variantes genéticas de todos los tumores consideradas en su conjunto. Con estos datos, no se puede establecer que en cada tumor considerado de forma individual estén afectadas cada una de estas vías. Otra de las limitaciones más relevantes para interpretar las vías de señalización alteradas en este trabajo, es que solamente se ha tenido en cuenta una de las capas biológicas informativa, el perfil mutacional. No se ha realizado un análisis integral de la patología a nivel molecular, evaluando otros factores tan relevantes como el número de copias génicas, el transcriptoma, los microRNAs, el proteoma, el epigenoma o el metaboloma.

Cacheux *et al* realizaron recientemente un análisis conjunto de mutaciones somáticas y del número de copias sobre 20 pacientes con carcinoma epidermoide mediante secuenciación completa del exoma. La mayoría de los pacientes incluidos en esta serie presentaban enfermedad localizada. El análisis combinado muestra que las vías más frecuentemente alteradas fueron la vía de PI3K/AKT/mTOR (60%), remodelación de la cromatina (45%) y proteólisis mediada por ubiquitina (35%) (131). Del mismo modo, Morris *et al*, realizaron secuenciación del exoma completo y número de copias sobre una muestra de 24 pacientes y un panel de genes sobre 17 pacientes adicionales, todos ellos

con enfermedad metastásica, encontrando alteraciones genéticas que afectaban fundamentalmente a *PIK3CA* (90% de los pacientes), y genes relacionados con la modificación de histonas y por tanto con la remodelación de la cromatina. Describe además mutaciones sobre genes que afectan a la diferenciación celular, la vía de Wnt o la reparación del ADN. Por otro lado, encuentran mutaciones sobre *RRBP1* no descritas previamente, pero no identifican alteraciones sobre *FBXW7* y la vía de la proteólisis mediada por ubiquitinación (129). El análisis de variantes de alto impacto del presente estudio, realizado sobre 45 pacientes reafirma el papel patogénico a nivel mutacional de la vía de la remodelación de la cromatina (*KTMD2*, *KMT2C*, *NSD1*) y de la proteólisis mediada por ubiquitina con *FBXW7*, el gen más frecuentemente mutado en la serie.

Otra de las limitaciones de este estudio a la hora de establecer las vías de señalización, ya comentada previamente, deriva de haber realizado un análisis de variantes genéticas muy restrictivo, limitado solamente a variantes de alto impacto funcional. Este tipo de análisis descarta entre otras, las variantes tipo *missense*. Así, con seguridad, se han desestimado genes con variantes que afectan a la patogénesis de esta neoplasia. Esta limitación afecta fundamentalmente a la baja sensibilidad para detectar variantes sobre oncogenes, lo que explica la discordancia en cuanto a frecuencia de mutaciones en *PIK3CA* con otros estudios. Como contrapartida, la ventaja de este análisis es que, las variantes recurrentes encontradas también con muy alta probabilidad van a jugar un papel conductor en esta patología.

6.4 Variantes genéticas asociadas a características clínico-patológicas

Además de describir las variantes de alto impacto y el perfil mutacional global en carcinoma epidermoide de ano, parece relevante identificar aquellas alteraciones diferenciales para determinadas características clínico-patológicas. Al tratarse únicamente de un estudio exploratorio se utilizó el listado de los genes obtenido mediante el análisis de VEP, que identifica variantes de alto impacto o moderado según se describe en el apartado de material y métodos.

6.4.1 Virus del papiloma humano

La mayoría de los mecanismos etiopatogénicos del carcinoma epidermoide de ano están vinculados a las proteínas oncogénicas del virus del papiloma humano. Sin embargo, existe un 15% de casos VPH (-), cuyo mecanismo se ha asociado fundamentalmente a mutación en *TP53*, mientras que la mutación de este gen en carcinoma escamoso de ano VPH (+) son excepcionales. Así, en dos estudios que analizan *TP53* en un panel, la frecuencia de mutaciones es del 23% (4 casos) y 69% (9 casos de 13) (130,236). Asimismo, el análisis mediante secuenciación del exoma encuentra mutación sobre *TP53* en el 67% (6 casos) y 100% (2 casos) en otros dos estudios, con diferencias estadísticamente significativas respecto a los casos VPH (+)(127,129).

En esta serie, solamente se encontraron 4 casos con variantes sobre *TP53* (menor al 10%), quedando fuera de los criterios de inclusión para la generación del listado de genes comparables para las características clínicas. No obstante, al tratarse del gen con mayor evidencia en la patogénesis del carcinoma de ano VPH (-) se incluyó en el análisis. Los resultados son concordantes con la escasa

literatura al respecto, encontrando variantes en dos de los cinco casos VPH (-) (40%), y otros dos casos sobre 33 (6%) en los carcinomas VPH (+).

Respecto al grueso del análisis comparativo, la observación más relevante es que todas las variantes genéticas diferenciales son más frecuentes en los tumores VPH (-), al igual que ocurre con *TP53*. Una explicación a estas diferencias puede estar relacionada con el fenómeno de hipermetilación presente en neoplasias asociadas a VPH, probablemente siendo necesario un menor número de mutaciones conductoras. Por ejemplo, en el proceso de carcinogénesis del carcinoma epidermoide de cérvix VPH (+) las lesiones premalignas, así como el propio carcinoma infiltrante presentan hipermetilación sobre regiones promotoras de genes supresores de tumores a través de la activación de la ADN-metil-transferasa por E6 y E7, que conlleva el silenciamiento génico (237,238). Además, el cáncer de cérvix asociado a VPH es un tumor con relativamente pocas mutaciones conductoras. Así mismo, el carcinoma de vulva muestra un mayor número de mutaciones *drivers* y una mayor carga mutacional en ausencia de VPH (239).

No se encontraron diferencias en 10 de las variantes de alto impacto recurrentes analizadas. Las otras seis no fueron analizadas por tener frecuencia inferior al 10% según análisis de impacto alto o moderado (ANEXO 1).

Los genes que han presentado significativamente mayor frecuencia de variantes en los tumores VPH (-) fueron *ZC3H13*, *ATXN2L*, *ATRNL1*, *ASCL1*, *NEB*, *KAT6B*, *RANBP2*, *PHACTR4*, *DMD*, *RYR2*, *C2orf16*, *BIRC6*, *CMYA5*, *PCNT* y *SDK1*. No se pueden establecer conclusiones definitivas al respecto teniendo en cuenta que se ha realizado únicamente un análisis exploratorio.

6.4.2 Estadios TNM. Afectación ganglionar.

Para crear una hipótesis de trabajo acerca de qué mutaciones genéticas se asocian a estadios más avanzados, y podrían permitir una ventaja oncogénica en la célula tumoral capaz de favorecer la progresión y el desarrollo de metástasis ganglionares, se hizo una comparación entre los estadios I-II vs III y por otro lado entre los casos N0 vs N1.

Se han identificado variantes sobre varios genes relacionados con un estadio más avanzado de la enfermedad. *ATM*, *MED1*, *SYNE1*, *CYFIP2*, *UTP14A* o *SLFN11*, destacan por su patogénesis en cáncer. Además, con mayor o menor grado de evidencia, coinciden en participar como genes supresores en cáncer, implicados en la respuesta al daño del ADN y apoptosis (240–244). Esta característica está ampliamente reconocida en el desarrollo y progresión del cáncer (245). *UTP14A* juega un papel anti-apoptótico mediante mecanismos dependientes e independientes de p53 (246,247). Los productos de estos genes participan en las vías de la reparación del ADN o de la apoptosis. *ATM* presenta una frecuencia en estadios I-II del 5% y un 42% en los estadios III. No hay datos en cáncer de ano al respecto. En otros tumores, con poblaciones de pacientes heterogéneas existen datos discordantes respecto al pronóstico. Por ejemplo, en adenocarcinoma colo-rectal o vejiga, la presencia de mutación de *ATM* o su pérdida de expresión en estadios localizados se asocia a peor pronóstico, mientras que en enfermedad metastásica se asocia a mejor pronóstico (248,249). En el presente estudio, no obstante, no se encontraron diferencias en SLE. Quizás la mayor sensibilidad a platinos podría explicar esta discordancia, siendo paralelamente un factor de mal pronóstico, pero predictivo de respuesta

a platinos. *CYFIP2* da lugar a una proteína pro-apoptótica mediada por p53, cuya inhibición promueve proliferación celular (241). El producto proteico de *SLFN11* inhibe la proliferación celular y sensibiliza a las células tumorales a agentes quimioterápicos del daño al ADN, actuando como respuesta al daño del ADN, y llevando a la célula a la muerte celular (242).

El resto de los genes diferenciales no han demostrado en la literatura una relación consistente con el desarrollo y progresión del cáncer, o han presentado mayor frecuencia de variantes en los tumores más localizados. Teniendo en cuenta las limitaciones que presenta este análisis no parece que sean relevantes en el estadio o la capacidad de generar metástasis ganglionares en carcinoma escamoso de ano.

Más allá de la comparación de alteraciones moleculares en diferentes estadios de enfermedad localizada, otros estudios han investigado los cambios respecto a la enfermedad metastásica en carcinoma escamoso de ano. Una comparación de mutaciones genéticas de tumor primario y recaídas sobre una pequeña muestra de pacientes encontró mayor presencia de mutaciones en *FBXW7* y menor de *EP300* en las recaídas (128). Sin embargo, en este mismo trabajo, la comparación de muestras pareadas de primarios y recaídas del mismo paciente (8 casos) no encontró diferencias ni en la carga ni en la firma mutacional.

En carcinoma de ano, también se han asociado alteraciones moleculares en otras capas biológicas asociadas al estadio tumoral. Por ejemplo, el análisis de un grupo de pacientes del ensayo clínico RTOG 98-11 demuestra que el silenciamiento génico mediante metilación de regiones CpG, mayoritariamente

correspondientes a promotores de genes supresores, se asocia a tumores mayores a 5cm y/o con afectación ganglionar (250).

6.5 Variantes genéticas con valor pronóstico

En carcinoma epidermoide de ano existe escasa información acerca del papel pronóstico que pueden jugar variantes genéticas en la recaída de la enfermedad. *Cacheux* et al, encontraron un mayor riesgo de recaída en pacientes con mutaciones sobre *PIK3CA*, mientras que otros estudios no encuentran diferencias (128,130). También se ha descrito mayor riesgo de recaídas en aquellos casos con mutación sobre *TP53* (130). En este trabajo no se han encontrado diferencias en riesgo de recaída para *PIK3CA* ni *FBXW7*, y *TP53* no ha sido evaluado por presentar una frecuencia de variantes inferior al 10%.

Con intención de evaluar nuevas variantes que pudieran presentar un papel pronóstico se evaluaron los 382 genes identificados mediante VEP para SLE. Se han identificado variantes en cinco genes que confieren peor pronóstico en esta serie de carcinoma escamoso de ano: *BRCA2*, *ZNF750*, *FAM208B*, *ZC3H13* y *ZNF599*.

Las variantes en *ZNF750*, no descritas hasta el momento en carcinoma epidermoide de ano, se asocian en este trabajo a una mediana de supervivencia libre de recaída significativamente inferior. La pérdida de expresión génica de *ZNF750* se asocia a mutación del gen y a un peor pronóstico en carcinoma epidermoide de esófago y cavidad oral. Como se ha explicado anteriormente, se trata de un gen supresor de tumores, cuyas vías moleculares oncogénicas no se conocen completamente.

En esta cohorte, las variantes en *BRCA2*, presentes en un 18% de los casos, también se asocian a una SLE inferior, en torno a 10 meses, planteándose por tanto la posibilidad de que se trate un factor de mal pronóstico. Aunque un estudio encuentra mutaciones de *BRCA2* en el 2,9% de los carcinomas escamosos de ano (127), no se ha descrito previamente su papel pronóstico en esta neoplasia. También se han descrito mutaciones de *BRCA2* en torno al 10% de los carcinomas de vulva (239,251) y pene (252,253). Por otro lado, se han asociado a infección por VPH en carcinoma de vulva (239).

El papel pronóstico de mutación germinal o somática de *BRCA2* se ha estudiado en otros tumores con conclusiones variables. En cáncer de próstata o mama se ha asociado a peor SG, en cáncer de páncreas es indiferente, y en cáncer de ovario se asocia a mejor SG y SLP (254–257). La mutación en *BRCA2* provoca un déficit en la reparación del ADN, y por tanto abre la oportunidad como diana terapéutica para platinos o inhibidores del PARP, por lo que, en pacientes tratados con platino es difícil diferenciar entre factor pronóstico positivo y factor predictivo de respuesta. En este estudio el número de pacientes con variantes en *BRCA2* tratados con cisplatino fue pequeño, y no permite analizar los datos.

Las variantes de *ZC3H13*, *ZNF599* y *FAM208B* también se han asociado a peor pronóstico en carcinoma escamoso de ano por primera vez. El papel de *FAM208B* es desconocido. *ZC3H13* y *ZNF599* parecen actuar a nivel epigenético, modificando la expresión génica o promoviendo la m6A metilación de mRNA (258). En líneas celulares de cáncer de colon, *ZC3H13* actúa como gen supresor de tumores a través de la inactivación de la vía de RAS-ERK y la

pérdida de expresión tumoral se ha asociado a tumores de colon más avanzados (259).

El pequeño tamaño muestral, que no ha permitido hacer ningún ajuste de la p-valor a los múltiples test realizados, el carácter exploratorio del mismo, la ausencia de estudios que permitan contrastar los hallazgos, y la ausencia de una cohorte de validación, obliga a interpretar estos resultados como generadores de hipótesis.

6.6 Limitaciones del estudio

Algunas de las limitaciones de este trabajo se han contextualizado en cada uno de los apartados de la discusión. A continuación, se discuten las limitaciones más relevantes.

6.6.1 Muestra parafinada.

Las muestras fijadas en formol y posteriormente embebidas en parafina permiten un manejo más adecuado para la práctica clínica. Sin embargo, esta forma de conservación provoca una mayor susceptibilidad en la fragmentación de ADN con mayor riesgo de degradación de la muestra, dificultando el proceso de extracción de ADN (260) y por tanto la sensibilidad de la técnica. No obstante, la mejora progresiva en la metodología de extracción de ADN, preparación de las muestras, así como en la propia secuenciación está permitiendo una gran fiabilidad en los resultados. Incluso, algunos estudios no han encontrado diferencias cuando la secuenciación de nueva generación se ha realizado en tejido congelado o parafinado (261).

6.6.2 Ausencia de muestras pareadas tumor-tejido sano

Las variantes identificadas en la muestra tumoral pueden ser somáticas, pero también podrían proceder de la línea germinal. Un análisis de secuenciación del exoma sin comparar con la línea germinal conlleva un elevado porcentaje de falsos positivos en las alteraciones encontradas (262). La mejor estrategia para conseguir una identificación precisa de las variantes somáticas en el tumor es la comparación de muestras pareadas tumor-tejido sano del paciente (262).

En este trabajo, al tratarse de un estudio retrospectivo, no se disponía de tejido sano para cada paciente, por lo que, aunque se hubiera dispuesto de presupuesto suficiente, no habría sido posible realizar el análisis de muestras pareadas. Para minimizar esta limitación se realizó un filtrado de las variantes presentes en una muestra de pacientes sanos en >1% de la población mediante GnomAD. Con esta aproximación, existe un riesgo, fundamentalmente de falsos positivos (262).

6.6.3 Ausencia de validación de las variantes mediante secuenciación Sanger

Otra de las limitaciones en la metodología de este trabajo es que no se ha realizado validación mediante secuenciación por Sanger de las variantes encontradas en el análisis de secuenciación de nueva generación, a pesar de que ésta técnica siempre se ha considerado el *gold standard* para el diagnóstico de variantes genéticas (263). Así, en la mayoría de los estudios de investigación se continúan validando las variantes encontradas.

Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que esta práctica podría no ser necesaria. Por ejemplo, un estudio reciente encuentra que es más probable que una única secuenciación por Sanger rechace la presencia de una verdadera mutación a que identifique un falso positivo de una variante identificada por secuenciación de nueva generación, concluyendo que la práctica debería modificarse y no incluir la validación por técnica de Sanger (264).

6.6.4 Falta de información sobre el papel patogénico de variantes

En las dos últimas décadas se está produciendo un avance exponencial en la tecnología de secuenciación y el desarrollo de herramientas de análisis de datos. Sin embargo, la interpretación de toda esta información está limitada por el desconocimiento del impacto funcional y patogénico de gran parte de las variantes genéticas, tanto en el genoma como en el exoma. Además, los criterios para establecer las variantes genéticas relevantes aún no están claramente establecidos (163). Todo ello impide extraer la máxima información a los datos obtenidos a día de hoy.

6.6.5 Análisis restrictivo de variantes de alto impacto

Una limitación comentada durante la discusión en varias ocasiones es que el análisis de variantes de alto impacto está más enfocado a la detección de variantes sobre genes supresores de tumores, y limita la sensibilidad para detectar variantes sobre oncogenes.

6.6.6 Tamaño muestral.

En este estudio solamente se han podido analizar 45 muestras de pacientes, que en términos generales corresponde a un tamaño muestral pequeño para

objetivos cualitativos, lo que dificulta poder asegurar una distribución representativa de la población a la hora de identificar las variantes conductoras en carcinoma epidermoide de ano, y por tanto, también las vías de señalización establecidas a partir de estas variantes.

Más relevante es esta limitación para obtener conclusiones fiables respecto a los objetivos cuantitativos, como establecer las variantes diferenciales en función de variables clínicas o aquellas variantes que tienen un papel pronóstico, donde la escasa potencia estadística, junto con el elevado número de comparaciones realizadas únicamente permiten establecer hipótesis de trabajo para futuros estudios.

A pesar de las limitaciones descritas, también se pueden resaltar algunas fortalezas de este trabajo. Por ejemplo, ante el aparente escaso número de pacientes incluidos en este estudio, hay que destacar que se trata de la serie de mayor tamaño muestral que realiza secuenciación del exoma completo sobre carcinoma escamoso de ano localizado. Por otro lado, se trata de una muestra homogénea de pacientes en cuanto a características clínicas, siendo la única serie que analiza exclusivamente tumores sin afectación metastásica, con biopsia procedente del tumor primario, lo que permite limitar el análisis a alteraciones moleculares menos tardías y, por tanto, con mayor potencial patogénico. Asimismo, todos los pacientes eran naïve para tratamiento quimio-radioterápico en el momento de la realización de la biopsia, limitando el sesgo de presentar un patrón mutacional añadido secundario a dichos tratamientos.

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

1. El perfil mutacional del carcinoma epidermoide de ano localizado presenta una baja frecuencia de variantes de alto impacto sobre múltiples genes.
2. Se han identificado 16 genes recurrentemente afectados por variantes de alto impacto: *FBXW7*, *CLTC*, *NEXN*, *ZNF750*, *ARHGAP21*, *CNOT7*, *COG1*, *FAT1*, *KIAA0753*, *KMT2C*, *KMT2D*, *NSD1*, *RHBG*, *SRRM3*, *SYNE2* y *TRAF3/p1*.
3. Entre las vías de señalización más frecuentemente afectadas por las variantes de alto impacto destacan la vía de Wnt, inflamación, angiogénesis, receptores de la colecistoquinina, apoptosis, receptor del factor de crecimiento epidérmico o la vía de las cadherinas. Todas estas vías están implicadas en los *hallmarks* del cáncer.
4. Se han encontrado diferencias en las alteraciones genéticas entre los tumores asociados y no asociados a VPH. Específicamente, se identificaron 15 genes, que presentan una mayor frecuencia de variantes en los carcinomas VPH (-).
5. En comparación con los estadios I y II, en el estadio III se han identificado 11 genes afectados por variantes. Entre estos genes, los más estudiados son genes supresores de tumores que están implicados en la reparación del ADN o en la apoptosis, como *ATM*, *CYFIP2*, *SLFN11*, *SYNE1* o *MED1*.
6. El análisis exploratorio muestra que las variantes en *BRCA2*, *ZNF750*, *ZC3H13*, *ZNF599* y *FAM208B* podrían impactar negativamente en la supervivencia libre de enfermedad.
7. Es necesario realizar estudios con mayor potencia estadística para validar los resultados encontrados.

BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019 Jan;69(1):7–34.
2. Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone A-M, Markowitz LE, Kohler B, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus(HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *J Natl Cancer Inst.* 2013 Feb 6;105(3):175–201.
3. Islami F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Bray F, Jemal A. International trends in anal cancer incidence rates. *Int J Epidemiol.* 2017 Jun 1;46(3):924–38.
4. de Souza DLB, Curado MP, Bernal MM, Jerez Roig J. What is the future burden of HPV-related cancers in Spain? *Clin Transl Oncol.* 2014 Feb;16(2):213–9.
5. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, et al. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer.* 2004 Jul 15;101(2):270–80.
6. Silverberg MJ, Lau B, Justice AC, Engels E, Gill MJ, Goedert JJ, et al. Risk of anal cancer in HIV-infected and HIV-uninfected individuals in North America. *Clin Infect Dis.* 2012 Apr;54(7):1026–34.
7. Amin MB, American Joint Committee on Cancer, American Cancer Society, editors. *AJCC cancer staging manual. Eight edition / editor-in-chief, Mahul B. Amin, MD, FCAP ; editors, Stephen B. Edge, MD, FACS [and 16 others] ; Donna M. Gress, RHIT, CTR-Technical editor ; Laura R. Meyer, CAPM-Managing editor.* Chicago IL: American Joint Committee on Cancer, Springer; 2017. 1024 p.
8. Glynne-Jones R, Nilsson PJ, Aschele C, Goh V, Peiffert D, Cervantes A, et al. Anal cancer: ESMO-ESSO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014 Sep;25 Suppl 3:iii10-20.
9. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):12–9.
10. Walboomers JM, Meijer CJ. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J Pathol.* 1997 Mar;181(3):253–4.
11. De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2009 Apr 1;124(7):1626–36.
12. Alemany L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I, Quirós B, Salmeron J, Shin H-R, et al. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *Int J Cancer.* 2015 Jan 1;136(1):98–107.
13. Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers E-M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of

- taxonomic amendments. *Virology*. 2010 May 25;401(1):70–9.
14. Munday JS. Bovine and human papillomaviruses: a comparative review. *Vet Pathol*. 2014 Nov;51(6):1063–75.
 15. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000 May 3;92(9):709–20.
 16. de Sanjosé S, Alemany L, Ordi J, Tous S, Alejo M, Bigby SM, et al. Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. *Eur J Cancer*. 2013 Nov;49(16):3450–61.
 17. Alemany L, Saunier M, Tinoco L, Quirós B, Alvarado-Cabrero I, Alejo M, et al. Large contribution of human papillomavirus in vaginal neoplastic lesions: a worldwide study in 597 samples. *Eur J Cancer*. 2014 Nov;50(16):2846–54.
 18. Alemany L, Cubilla A, Halc G, Kasamatsu E, Quirós B, Masferrer E, et al. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *Eur Urol*. 2016;69(5):953–61.
 19. Chaturvedi AK. Beyond cervical cancer: burden of other HPV-related cancers among men and women. *J Adolesc Health*. 2010 Apr;46(4 Suppl):S20–26.
 20. Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Meijer CJ, Walboomers JM, et al. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N Engl J Med*. 1997 Nov 6;337(19):1350–8.
 21. Satterwhite CL, Torrone E, Meites E, Dunne EF, Mahajan R, Ocfemia MCB, et al. Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008. *Sex Transm Dis*. 2013 Mar;40(3):187–93.
 22. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006;2006 Suppl:40470.
 23. Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Goodman MT, Sudenga SL, et al. EUROGIN 2014 roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J Cancer*. 2015 Jun 15;136(12):2752–60.
 24. Chin-Hong PV, Vittinghoff E, Cranston RD, Buchbinder S, Cohen D, Colfax G, et al. Age-Specific prevalence of anal human papillomavirus infection in HIV-negative sexually active men who have sex with men: the EXPLORE study. *J Infect Dis*. 2004 Dec 15;190(12):2070–6.
 25. Donà MG, Palamara G, Di Carlo A, Latini A, Vocaturo A, Benevolo M, et al. Prevalence, genotype diversity and determinants of anal HPV infection in HIV-uninfected men having sex with men. *J Clin Virol*. 2012 Jun;54(2):185–9.
 26. Hernandez BY, McDuffie K, Zhu X, Wilkens LR, Killeen J, Kessel B, et al. Anal human papillomavirus infection in women and its relationship with cervical infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Nov;14(11 Pt 1):2550–6.

27. Castro FA, Quint W, Gonzalez P, Katki HA, Herrero R, van Doorn L-J, et al. Prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus infection among young healthy women in Costa Rica. *J Infect Dis.* 2012 Oct 1;206(7):1103–10.
28. Nyitray AG, Smith D, Villa L, Lazcano-Ponce E, Abrahamsen M, Papenfuss M, et al. Prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus infection in men who have sex with women: a cross-national study. *J Infect Dis.* 2010 May 15;201(10):1498–508.
29. Machalek DA, Poynten M, Jin F, Fairley CK, Farnsworth A, Garland SM, et al. Anal human papillomavirus infection and associated neoplastic lesions in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2012 May;13(5):487–500.
30. Winer RL, Lee S-K, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 2003 Feb 1;157(3):218–26.
31. Moscicki A-B, Durako SJ, Houser J, Ma Y, Murphy DA, Darragh TM, et al. Human papillomavirus infection and abnormal cytology of the anus in HIV-infected and uninfected adolescents. *AIDS.* 2003 Feb 14;17(3):311–20.
32. Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X, Thompson P, McDuffie K, Shvetsov YB, et al. Transmission of human papillomavirus in heterosexual couples. *Emerging Infect Dis.* 2008 Jun;14(6):888–94.
33. Sonnex C, Strauss S, Gray JJ. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. *Sex Transm Infect.* 1999 Oct;75(5):317–9.
34. Partridge JM, Hughes JP, Feng Q, Winer RL, Weaver BA, Xi L-F, et al. Genital human papillomavirus infection in men: incidence and risk factors in a cohort of university students. *J Infect Dis.* 2007 Oct 15;196(8):1128–36.
35. Malagón T, Louvanto K, Wissing M, Burchell AN, Tellier P-P, El-Zein M, et al. Hand-to-genital and genital-to-genital transmission of human papillomaviruses between male and female sexual partners (HITCH): a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2019 Mar;19(3):317–26.
36. Nyitray AG, Carvalho da Silva RJ, Baggio ML, Lu B, Smith D, Abrahamsen M, et al. Age-specific prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus (HPV) among men who have sex with women and men who have sex with men: the HPV in men (HIM) study. *J Infect Dis.* 2011 Jan 1;203(1):49–57.
37. Pamnani SJ, Nyitray AG, Abrahamsen M, Rollison DE, Villa LL, Lazcano-Ponce E, et al. Sequential Acquisition of Anal Human Papillomavirus (HPV) Infection Following Genital Infection Among Men Who Have Sex With Women: The HPV Infection in Men (HIM) Study. *J Infect Dis.* 2016 Oct 15;214(8):1180–7.
38. Chaturvedi AK, Engels EA, Gilbert ES, Chen BE, Storm H, Lynch CF, et al. Second cancers among 104,760 survivors of cervical cancer: evaluation of long-term risk. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Nov 7;99(21):1634–43.
39. Stier EA, Sebring MC, Mendez AE, Ba FS, Trimble DD, Chiao EY. Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal HPV-related disorders in women: a

- systematic review. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 Sep;213(3):278–309.
40. Tseng H-F, Morgenstern H, Mack TM, Peters RK. Risk factors for anal cancer: results of a population-based case-control study. *Cancer Causes Control.* 2003 Nov;14(9):837–46.
41. Goodman MT, Shvetsov YB, McDuffie K, Wilkens LR, Zhu X, Ning L, et al. Acquisition of anal human papillomavirus (HPV) infection in women: the Hawaii HPV Cohort study. *J Infect Dis.* 2008 Apr 1;197(7):957–66.
42. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM, ALTS Group. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis.* 2007 Jun 1;195(11):1582–9.
43. Shvetsov YB, Hernandez BY, McDuffie K, Wilkens LR, Zhu X, Ning L, et al. Duration and Clearance of Anal Human Papillomavirus (HPV) Infection among Women: The Hawaii HPV Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases.* 2009 Mar;48(5):536–46.
44. Nyitray AG, Carvalho da Silva RJ, Baggio ML, Smith D, Abrahamsen M, Papenfuss M, et al. Six-Month Incidence, Persistence, and Factors Associated With Persistence of Anal Human Papillomavirus in Men: The HPV in Men Study. *Journal of Infectious Diseases.* 2011 Dec 1;204(11):1711–22.
45. Patel P, Bush T, Kojic EM, Conley L, Unger ER, Darragh TM, et al. Prevalence, incidence, and clearance of anal high-risk human papillomavirus (HPV) infection among HIV-infected men in the SUN Study. *J Infect Dis.* 2017 Dec 4;
46. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, Da Costa M null, Greenblatt RM. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Infect Dis.* 2001 Feb 1;183(3):383–91.
47. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, Jay N. Prevalence and risk factors for human papillomavirus infection of the anal canal in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative homosexual men. *J Infect Dis.* 1998 Feb;177(2):361–7.
48. Ogunbiyi OA, Scholefield JH, Raftery AT, Smith JH, Duffy S, Sharp F, et al. Prevalence of anal human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia in renal allograft recipients. *Br J Surg.* 1994 Mar;81(3):365–7.
49. Tramujas da Costa e Silva I, de Lima Ferreira LC, Santos Gimenez F, Gonçalves Guimarães RA, Botinelly Fujimoto L, Barbosa Cabral CR, et al. High-resolution anoscopy in the diagnosis of anal cancer precursor lesions in renal graft recipients. *Ann Surg Oncol.* 2008 May;15(5):1470–5.
50. Daling JR, Sherman KJ, Hislop TG, Maden C, Mandelson MT, Beckmann AM, et al. Cigarette smoking and the risk of anogenital cancer. *Am J Epidemiol.* 1992 Jan 15;135(2):180–9.
51. Alemany L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I, Quirós B, Salmeron J, Shin H-R, et al. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas

- worldwide: HPV in Anal Cancers. *International Journal of Cancer*. 2015 Jan 1;136(1):98–107.
52. Gervaz P, Hirschel B, Morel P. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the anus. *Br J Surg*. 2006 May;93(5):531–8.
53. Litwin TR, Clarke MA, Dean M, Wentzensen N. Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis. *Viruses*. 2017 03;9(8).
54. Krzowska-Firych J, Lucas G, Lucas C, Lucas N, Pietrzyk Ł. An overview of Human Papillomavirus (HPV) as an etiological factor of the anal cancer. *J Infect Public Health*. 2018 Jul 3;
55. Araldi RP, Sant’Ana TA, Módolo DG, de Melo TC, Spadacci-Morena DD, de Cassia Stocco R, et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomed Pharmacother*. 2018 Oct;106:1537–56.
56. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990 Apr 6;248(4951):76–9.
57. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990 Dec 21;63(6):1129–36.
58. Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. 1999 Dec 13;18(53):7690–700.
59. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989 Feb 17;243(4893):934–7.
60. Hu G, Liu W, Hanania EG, Fu S, Wang T, Deisseroth AB. Suppression of tumorigenesis by transcription units expressing the antisense E6 and E7 messenger RNA (mRNA) for the transforming proteins of the human papilloma virus and the sense mRNA for the retinoblastoma gene in cervical carcinoma cells. *Cancer Gene Ther*. 1995 Mar;2(1):19–32.
61. Thomas LK, Bermejo JL, Vinokurova S, Jensen K, Bierkens M, Steenbergen R, et al. Chromosomal gains and losses in human papillomavirus-associated neoplasia of the lower genital tract - a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2014 Jan;50(1):85–98.
62. Heselmeyer K, du Manoir S, Blegen H, Friberg B, Svensson C, Schröck E, et al. A recurrent pattern of chromosomal aberrations and immunophenotypic appearance defines anal squamous cell carcinomas. *Br J Cancer*. 1997;76(10):1271–8.
63. Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol*. 1985 Jul;66 (Pt 7):1515–22.
64. Bodelon C, Vinokurova S, Sampson JN, den Boon JA, Walker JL, Horswill MA, et al. Chromosomal copy number alterations and HPV integration in cervical precancer and invasive cancer. *Carcinogenesis*. 2016 Feb;37(2):188–96.

65. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3878–84.
66. Hu Z, Zhu D, Wang W, Li W, Jia W, Zeng X, et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat Genet.* 2015 Feb;47(2):158–63.
67. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Feb 28;92(5):1654–8.
68. Tong WWY, Jin F, McHugh LC, Maher T, Sinclair B, Grulich AE, et al. Progression to and spontaneous regression of high-grade anal squamous intraepithelial lesions in HIV-infected and uninfected men. *AIDS.* 2013 Sep 10;27(14):2233–43.
69. Burgos J, Curran A, Tallada N, Guelar A, Navarro J, Landolfi S, et al. Risk of progression to high-grade anal intraepithelial neoplasia in HIV-infected MSM. *AIDS.* 2015 Mar 27;29(6):695–702.
70. Scholefield JH, Castle MT, Watson NFS. Malignant transformation of high-grade anal intraepithelial neoplasia. *Br J Surg.* 2005 Sep;92(9):1133–6.
71. Watson AJM, Smith BB, Whitehead MR, Sykes PH, Frizelle FA. Malignant progression of anal intra-epithelial neoplasia. *ANZ J Surg.* 2006 Aug;76(8):715–7.
72. Marin-Muller C, Li M, Chen C, Yao Q. Current understanding and potential immunotherapy for HIV-associated squamous cell carcinoma of the anus (SCCA). *World J Surg.* 2009 Apr;33(4):653–60.
73. Bernardi M-P, Ngan SY, Michael M, Lynch AC, Heriot AG, Ramsay RG, et al. Molecular biology of anal squamous cell carcinoma: implications for future research and clinical intervention. *Lancet Oncol.* 2015 Dec;16(16):e611–621.
74. Caberg J-HD, Hubert PM, Begon DY, Herfs MF, Roncarati PJ, Boniver JJ, et al. Silencing of E7 oncogene restores functional E-cadherin expression in human papillomavirus 16-transformed keratinocytes. *Carcinogenesis.* 2008 Jul;29(7):1441–7.
75. Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, Moreira ED, Aranda C, Jessen H, et al. HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med.* 2011 Oct 27;365(17):1576–85.
76. Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, Jaisamrarn U, Garland SM, Castellsagué X, et al. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol.* 2012 Jan;13(1):89–99.
77. Drolet M, Bénard É, Boily M-C, Ali H, Baandrup L, Bauer H, et al. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2015 May;15(5):565–80.
78. Wheeler CM, Castellsagué X, Garland SM, Szarewski A, Paavonen J, Naud P, et al. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical

- infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol.* 2012 Jan;13(1):100–10.
79. Schmeler KM, Sturgis EM. Expanding the benefits of HPV vaccination to boys and men. *Lancet.* 2016 Apr 30;387(10030):1798–9.
80. Morris VK, Rashid A, Rodriguez-Bigas M, Das P, Chang G, Ohinata A, et al. Clinicopathologic Features Associated With Human Papillomavirus/p16 in Patients With Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Anal Canal. *Oncologist.* 2015 Nov;20(11):1247–52.
81. Rödel F, Wieland U, Fraunholz I, Kitz J, Rave-Fränk M, Wolff HA, et al. Human papillomavirus DNA load and p16INK4a expression predict for local control in patients with anal squamous cell carcinoma treated with chemoradiotherapy. *Int J Cancer.* 2015 Jan 15;136(2):278–88.
82. Yhim H-Y, Lee N-R, Song E-K, Kwak J-Y, Lee ST, Kim JH, et al. The prognostic significance of tumor human papillomavirus status for patients with anal squamous cell carcinoma treated with combined chemoradiotherapy. *Int J Cancer.* 2011 Oct 1;129(7):1752–60.
83. Meulendijks D, Tomaso NB, Dewit L, Smits PHM, Bakker R, van Velthuisen M-LF, et al. HPV-negative squamous cell carcinoma of the anal canal is unresponsive to standard treatment and frequently carries disruptive mutations in TP53. *Br J Cancer.* 2015 Apr 14;112(8):1358–66.
84. Regauer S, Kashofer K, Reich O. Time series analysis of TP53 gene mutations in recurrent HPV-negative vulvar squamous cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2018 Oct 5;
85. Kashofer K, Winter E, Halbwedl I, Thueringer A, Kreiner M, Sauer S, et al. HPV-negative penile squamous cell carcinoma: disruptive mutations in the TP53 gene are common. *Mod Pathol.* 2017;30(7):1013–20.
86. Ryan DP, Compton CC, Mayer RJ. Carcinoma of the Anal Canal. *N Engl J Med.* 2000;342:792–800.
87. Bartelink H, Roelofsen F, Eschwege F, Rougier P, Bosset JF, Gonzalez DG, et al. Concomitant radiotherapy and chemotherapy is superior to radiotherapy alone in the treatment of locally advanced anal cancer: results of a phase III randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Gastrointestinal Cooperative Groups. *J Clin Oncol.* 1997 May;15(5):2040–9.
88. Epidermoid anal cancer: results from the UKCCCR randomised trial of radiotherapy alone versus radiotherapy, 5-fluorouracil, and mitomycin. UKCCCR Anal Cancer Trial Working Party. UK Co-ordinating Committee on Cancer Research. *Lancet.* 1996 Oct 19;348(9034):1049–54.
89. Ajani JA, Winter KA, Gunderson LL, Pedersen J, Benson AB, Thomas CR, et al. Fluorouracil, mitomycin, and radiotherapy vs fluorouracil, cisplatin, and radiotherapy for carcinoma of the anal canal: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2008 Apr 23;299(16):1914–21.
90. James RD, Glynne-Jones R, Meadows HM, Cunningham D, Myint AS,

- Saunders MP, et al. Mitomycin or cisplatin chemoradiation with or without maintenance chemotherapy for treatment of squamous-cell carcinoma of the anus (ACT II): a randomised, phase 3, open-label, 2×2 factorial trial. *Lancet Oncol*. 2013 May;14(6):516–24.
91. Peiffert D, Tournier-Rangear L, Gérard J-P, Lemanski C, François E, Giovannini M, et al. Induction chemotherapy and dose intensification of the radiation boost in locally advanced anal canal carcinoma: final analysis of the randomized UNICANCER ACCORD 03 trial. *J Clin Oncol*. 2012 Jun 1;30(16):1941–8.
92. Northover J, Glynne-Jones R, Sebag-Montefiore D, James R, Meadows H, Wan S, et al. Chemoradiation for the treatment of epidermoid anal cancer: 13-year follow-up of the first randomised UKCCCR Anal Cancer Trial (ACT I). *Br J Cancer*. 2010 Mar 30;102(7):1123–8.
93. Glynne-Jones R, Sebag-Montefiore D, Adams R, Gollins S, Harrison M, Meadows HM, et al. Prognostic factors for recurrence and survival in anal cancer: generating hypotheses from the mature outcomes of the first United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research Anal Cancer Trial (ACT I). *Cancer*. 2013 Feb 15;119(4):748–55.
94. Ajani JA, Winter KA, Gunderson LL, Pedersen J, Benson AB, Thomas CR, et al. Prognostic factors derived from a prospective database dictate clinical biology of anal cancer: the intergroup trial (RTOG 98-11). *Cancer*. 2010 Sep 1;116(17):4007–13.
95. Ajani JA, Winter KA, Gunderson LL, Pedersen J, Benson AB, Thomas CR, et al. US intergroup anal carcinoma trial: tumor diameter predicts for colostomy. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 1;27(7):1116–21.
96. Glynne-Jones R, Kadalayil L, Meadows HM, Cunningham D, Samuel L, Geh JJ, et al. Tumour- and treatment-related colostomy rates following mitomycin C or cisplatin chemoradiation with or without maintenance chemotherapy in squamous cell carcinoma of the anus in the ACT II trial. *Ann Oncol*. 2014 Aug;25(8):1616–22.
97. Faivre J-C, Peiffert D, Vendrely V, Lemanski C, Hannoun-Levi J-M, Mirabel X, et al. Prognostic factors of colostomy free survival in patients presenting with locally advanced anal canal carcinoma: A pooled analysis of two prospective trials (KANAL 2 and ACCORD 03). *Radiother Oncol*. 2018 Aug 29;
98. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Rock CE, Stewart AK, Ko CY, Halverson A. Outcomes and prognostic factors for squamous-cell carcinoma of the anal canal: analysis of patients from the National Cancer Data Base. *Dis Colon Rectum*. 2009 Apr;52(4):624–31.
99. Soares PC, Abdelhay ES, Thuler LCS, Soares BM, Demachki S, Ferro GVR, et al. HPV positive, wild type TP53, and p16 overexpression correlate with the absence of residual tumors after chemoradiotherapy in anal squamous cell carcinoma. *BMC Gastroenterol*. 2018 Feb 21;18(1):30.
100. Serup-Hansen E, Linnemann D, Skovrider-Ruminski W, Høgdall E, Geertsens PF, Havsteen H. Human papillomavirus genotyping and p16 expression as prognostic factors for patients with American Joint Committee on Cancer stages I to III carcinoma of the anal canal. *J Clin Oncol*. 2014 Jun 10;32(17):1812–7.

101. Jhaveri J, Rayfield L, Liu Y, Chowdhary M, Cassidy RJ, Madden NA, et al. Prognostic relevance of human papillomavirus infection in anal squamous cell carcinoma: analysis of the national cancer data base. *J Gastrointest Oncol.* 2017 Dec;8(6):998–1008.
102. Perez RO, Julião GPS, Vailati BB. Nodal status and survival in anal cancer. *Lancet Oncol.* 2017;18(10):1292–3.
103. Oweira H, Giryas A, Mannhart M, Decker M, Schlumpf R, Abdel-Rahman O. Assessment of the external validity of the American Joint Committee on Cancer 8th staging system for anal carcinoma. *Curr Med Res Opin.* 2018 May;34(5):923–9.
104. Franco P, Montagnani F, Arcadipane F, Casadei C, Andrikou K, Martini S, et al. The prognostic role of hemoglobin levels in patients undergoing concurrent chemoradiation for anal cancer. *Radiat Oncol.* 2018 May 2;13(1):83.
105. Janssens GO, Rademakers SE, Terhaard CH, Doornaert PA, Bijl HP, van den Ende P, et al. Improved recurrence-free survival with ARCON for anemic patients with laryngeal cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 Mar 1;20(5):1345–54.
106. Kapacee ZA, Susnerwala S, Wise M, Biswas A, Danwata F, Scott N. Chemoradiotherapy for squamous cell anal carcinoma: a review of prognostic factors. *Colorectal Dis.* 2016 Nov;18(11):1080–6.
107. Ravenda PS, Magni E, Botteri E, Manzotti M, Barberis M, Vacirca D, et al. Prognostic value of human papillomavirus in anal squamous cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014 Nov;74(5):1033–8.
108. Koerber SA, Schoneweg C, Slynko A, Krug D, Haefner MF, Herfarth K, et al. Influence of human papillomavirus and p16(INK4a) on treatment outcome of patients with anal cancer. *Radiother Oncol.* 2014 Dec;113(3):331–6.
109. Mai S, Welzel G, Ottstadt M, Lohr F, Severa S, Prigge E-S, et al. Prognostic Relevance of HPV Infection and p16 Overexpression in Squamous Cell Anal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015 Nov 15;93(4):819–27.
110. Sun G, Dong X, Tang X, Qu H, Zhang H, Zhao E. The prognostic value of HPV combined p16 status in patients with anal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2018 Jan 30;9(8):8081–8.
111. Bonin SR, Pajak TF, Russell AH, Coia LR, Paris KJ, Flam MS, et al. Overexpression of p53 protein and outcome of patients treated with chemoradiation for carcinoma of the anal canal: a report of randomized trial RTOG 87-04. Radiation Therapy Oncology Group. *Cancer.* 1999 Mar 15;85(6):1226–33.
112. Wong CS, Tsao MS, Sharma V, Chapman WB, Pintilie M, Cummings BJ. Prognostic role of p53 protein expression in epidermoid carcinoma of the anal canal. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999 Sep 1;45(2):309–14.
113. Lampejo T, Kavanagh D, Clark J, Goldin R, Osborn M, Ziprin P, et al. Prognostic biomarkers in squamous cell carcinoma of the anus: a systematic review. *Br J Cancer.* 2010 Dec 7;103(12):1858–69.
114. Holm R, Skovlund E, Skomedal H, Flørenes VA, Tanum G. Reduced expression

- of p21WAF1 is an indicator of malignant behaviour in anal carcinomas. *Histopathology*. 2001 Jul;39(1):43–9.
115. Nilsson PJ, Lenander C, Rubio C, Auer G, Ljungqvist O, Glimelius B. Prognostic significance of Cyclin A in epidermoid anal cancer. *Oncol Rep*. 2006 Sep;16(3):443–9.
116. Fraunholz I, Rödel F, Kohler D, Diallo-Georgiopoulou M, Distel L, Falk S, et al. Epidermal growth factor receptor expression as prognostic marker in patients with anal carcinoma treated with concurrent chemoradiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013 Aug 1;86(5):901–7.
117. Richter I, Jirasek T, Dvorak J, Cermakova E, Bartos J. The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in patients with anal carcinoma. *Neoplasma*. 2016;63(3):435–41.
118. Alvarez G, Perry A, Tan BR, Wang HL. Expression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinomas of the anal canal is independent of gene amplification. *Mod Pathol*. 2006 Jul;19(7):942–9.
119. Ajani JA, Wang X, Izzo JG, Crane CH, Eng C, Skibber JM, et al. Molecular biomarkers correlate with disease-free survival in patients with anal canal carcinoma treated with chemoradiation. *Dig Dis Sci*. 2010 Apr;55(4):1098–105.
120. Bidinotto LT, Véo CAR, Loaiza EA, De França APS, Lorenzi AT, Rosa LAR, et al. Low mutation percentage of KRAS and BRAF genes in Brazilian anal tumors. *Mol Med Rep*. 2016 Oct;14(4):3791–7.
121. Serup-Hansen E, Linnemann D, Høgdall E, Geertsens PF, Havsteen H. KRAS and BRAF mutations in anal carcinoma. *APMIS*. 2015 Jan;123(1):53–9.
122. Myklebust MP, Fluge Ø, Immervoll H, Skarstein A, Balteskard L, Bruland O, et al. Expression of DSG1 and DSC1 are prognostic markers in anal carcinoma patients. *Br J Cancer*. 2012 Feb 14;106(4):756–62.
123. Dusek RL, Getsios S, Chen F, Park JK, Amargo EV, Cryns VL, et al. The differentiation-dependent desmosomal cadherin desmoglein 1 is a novel caspase-3 target that regulates apoptosis in keratinocytes. *J Biol Chem*. 2006 Feb 10;281(6):3614–24.
124. Getsios S, Simpson CL, Kojima S, Harmon R, Sheu LJ, Dusek RL, et al. Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. *J Cell Biol*. 2009 Jun 29;185(7):1243–58.
125. Rödel F, Steinhäuser K, Kreis N-N, Friemel A, Martin D, Wieland U, et al. Prognostic impact of RITA expression in patients with anal squamous cell carcinoma treated with chemoradiotherapy. *Radiother Oncol*. 2018;126(2):214–21.
126. Zhang J, Bajari R, Andric D, Gerthoffert F, Lepsa A, Nahal-Bose H, et al. The International Cancer Genome Consortium Data Portal. *Nature Biotechnology*. 2019 Apr 1;37(4):367–9.
127. Chung JH, Sanford E, Johnson A, Klempner SJ, Schrock AB, Palma NA, et al. Comprehensive genomic profiling of anal squamous cell carcinoma reveals distinct

- genomically defined classes. *Ann Oncol*. 2016 Jul;27(7):1336–41.
128. Mouw KW, Cleary JM, Reardon B, Pike J, Braunstein LZ, Kim J, et al. Genomic Evolution after Chemoradiotherapy in Anal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2017 Jun 15;23(12):3214–22.
129. Morris V, Rao X, Pickering C, Foo WC, Rashid A, Eterovic K, et al. Comprehensive Genomic Profiling of Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Anal Canal. *Mol Cancer Res*. 2017 Nov;15(11):1542–50.
130. Cacheux W, Rouleau E, Briaux A, Tsantoulis P, Mariani P, Richard-Molard M, et al. Mutational analysis of anal cancers demonstrates frequent PIK3CA mutations associated with poor outcome after salvage abdominoperineal resection. *Br J Cancer*. 2016 Jun 14;114(12):1387–94.
131. Cacheux W, Dangles-Marie V, Rouleau E, Lazardigues J, Girard E, Briaux A, et al. Exome sequencing reveals aberrant signalling pathways as hallmark of treatment-naïve anal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018 Jan 2;9(1):464–76.
132. Schernberg A, Escande A, Rivin Del Campo E, Ducreux M, Nguyen F, Goere D, et al. Leukocytosis and neutrophilia predicts outcome in anal cancer. *Radiother Oncol*. 2017;122(1):137–45.
133. Schernberg A, Huguet F, Moureau-Zabotto L, Chargari C, Rivin Del Campo E, Schlienger M, et al. External validation of leukocytosis and neutrophilia as a prognostic marker in anal carcinoma treated with definitive chemoradiation. *Radiother Oncol*. 2017;124(1):110–7.
134. Gauthé M, Richard-Molard M, Rigault E, Buecher B, Mariani P, Bellet D, et al. Prognostic value of serum CYFRA 21-1 in patients with anal canal squamous cell carcinoma treated with radio(chemo)therapy. *BMC Cancer*. 2018 13;18(1):417.
135. Williams M, Swampillai A, Osborne M, Mawdsley S, Hughes R, Harrison M, et al. Squamous cell carcinoma antigen: a potentially useful prognostic marker in squamous cell carcinoma of the anal canal and margin. *Cancer*. 2013 Jul 1;119(13):2391–8.
136. Cabel L, Jeannot E, Bieche I, Vacher S, Callens C, Bazire L, et al. Prognostic Impact of Residual HPV ctDNA Detection after Chemoradiotherapy for Anal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2018 Nov 15;24(22):5767–71.
137. Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ, Meyer F, Busch C-J, Petersen C, et al. HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol*. 2013 May;107(2):242–6.
138. Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, Torres AD, Martin JA, Yang RZ, et al. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res*. 2013 Aug 1;73(15):4791–800.
139. Beahrs O. Janeway Lecture. Management of cancer of the anus. *AJR Am J Roentgenol*. 1979 Nov;133(5):790–5.
140. Nigro ND, Vaitkevicius VK, Considine B. Combined therapy for cancer of the anal canal: a preliminary report. *Dis Colon Rectum*. 1974 Jun;17(3):354–6.

141. Cummings B, Keane T, Thomas G, Harwood A, Rider W. Results and toxicity of the treatment of anal canal carcinoma by radiation therapy or radiation therapy and chemotherapy. *Cancer*. 1984 Nov 15;54(10):2062–8.
142. Nigro ND, Seydel HG, Considine B, Vaitkevicius VK, Leichman L, Kinzie JJ. Combined preoperative radiation and chemotherapy for squamous cell carcinoma of the anal canal. *Cancer*. 1983 May 15;51(10):1826–9.
143. Flam M, John M, Pajak TF, Petrelli N, Myerson R, Doggett S, et al. Role of mitomycin in combination with fluorouracil and radiotherapy, and of salvage chemoradiation in the definitive nonsurgical treatment of epidermoid carcinoma of the anal canal: results of a phase III randomized intergroup study. *J Clin Oncol*. 1996 Sep;14(9):2527–39.
144. Rao S, Scalfani F, Eng C, Grønlie Guren M, Adams RA, Benson A, et al. LBA21InterAACT: A multicentre open label randomised phase II advanced anal cancer trial of cisplatin (CDDP) plus 5-fluorouracil (5-FU) vs carboplatin (C) plus weekly paclitaxel (P) in patients (pts) with inoperable locally recurrent (ILR) or metastatic treatment naïve disease - An International Rare Cancers Initiative (IRCI) trial. *Annals of Oncology*. 2018 Oct 1;29(suppl_8):mdy424.022-mdy424.022.
145. Morris VK, Salem ME, Nimeiri H, Iqbal S, Singh P, Ciombor K, et al. Nivolumab for previously treated unresectable metastatic anal cancer (NCI9673): a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2017;18(4):446–53.
146. Ott PA, Piha-Paul SA, Munster P, Pishvaian MJ, van Brummelen EMJ, Cohen RB, et al. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with recurrent carcinoma of the anal canal. *Ann Oncol*. 2017 01;28(5):1036–41.
147. Kamps R, Brandão RD, Bosch BJ van den, Paulussen ADC, Xanthoulea S, Blok MJ, et al. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 31;18(2).
148. Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet*. 2010 Oct 15;19(R2):R227–240.
149. Gasc C, Peyretailade E, Peyret P. Sequence capture by hybridization to explore modern and ancient genomic diversity in model and nonmodel organisms. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jun 2;44(10):4504–18.
150. Albert TJ, Molla MN, Muzny DM, Nazareth L, Wheeler D, Song X, et al. Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nat Methods*. 2007 Nov;4(11):903–5.
151. Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, Rogov P, LeProust EM, Brockman W, et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotechnol*. 2009 Feb;27(2):182–9.
152. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016 17;17(6):333–51.
153. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008 Oct;26(10):1135–45.

154. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31–46.
155. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014 Sep;30(9):418–26.
156. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet.* 2018;34(9):666–81.
157. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 2011 May 2;17(1):10.
158. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 2011 Mar 15;27(6):863–4.
159. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009 Jul 15;25(14):1754–60.
160. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009 Aug 15;25(16):2078–9.
161. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010 Sep;20(9):1297–303.
162. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol.* 2013 Mar;31(3):213–9.
163. Jalali Sefid Dashti M, Gamielien J. A practical guide to filtering and prioritizing genetic variants. *BioTechniques.* 2017 01;62(1):18–30.
164. VarSeq™ (Version 8.x) [Software]. Bozeman, MT: Golden Helix, Inc. Available from <http://www.goldenhelix.com>.
165. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016 18;536(7616):285–91.
166. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, et al. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(D1):D754–61.
167. Mi H, Muruganujan A, Ebert D, Huang X, Thomas PD. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D419–26.
168. Mi H, Muruganujan A, Huang X, Ebert D, Mills C, Guo X, et al. Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nat Protoc.* 2019;14(3):703–21.
169. McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016 06;17(1):122.
170. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G,

- et al. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*. 2011 Jan 10;29:24–6.
171. Yeh C-H, Bellon M, Nicot C. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. *Mol Cancer*. 2018 07;17(1):115.
172. Mao J-H, Kim I-J, Wu D, Climent J, Kang HC, DelRosario R, et al. FBXW7 targets mTOR for degradation and cooperates with PTEN in tumor suppression. *Science*. 2008 Sep 12;321(5895):1499–502.
173. Lupini L, Bassi C, Mlcochova J, Musa G, Russo M, Vychytilova-Faltejskova P, et al. Prediction of response to anti-EGFR antibody-based therapies by multigene sequencing in colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2015 Oct 27;15:808.
174. Li N, Lorenzi F, Kalakouti E, Normatova M, Babaei-Jadidi R, Tomlinson I, et al. FBXW7-mutated colorectal cancer cells exhibit aberrant expression of phosphorylated-p53 at Serine-15. *Oncotarget*. 2015 Apr 20;6(11):9240–56.
175. Zhou X, Jin W, Jia H, Yan J, Zhang G. MiR-223 promotes the cisplatin resistance of human gastric cancer cells via regulating cell cycle by targeting FBXW7. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015 Mar 26;34:28.
176. Ye M, Zhang Y, Zhang X, Zhang J, Jing P, Cao L, et al. Targeting FBW7 as a Strategy to Overcome Resistance to Targeted Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*. 2017 01;77(13):3527–39.
177. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*. 2017 13;36(28):3943–56.
178. Kitade S, Onoyama I, Kobayashi H, Yagi H, Yoshida S, Kato M, et al. FBXW7 is involved in the acquisition of the malignant phenotype in epithelial ovarian tumors. *Cancer Sci*. 2016 Oct;107(10):1399–405.
179. Grim JE, Knoblaugh SE, Guthrie KA, Hagar A, Swanger J, Hespelt J, et al. Fbw7 and p53 cooperatively suppress advanced and chromosomally unstable intestinal cancer. *Mol Cell Biol*. 2012 Jun;32(11):2160–7.
180. Hazawa M, Lin D-C, Handral H, Xu L, Chen Y, Jiang Y-Y, et al. ZNF750 is a lineage-specific tumour suppressor in squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2017 20;36(16):2243–54.
181. Otsuka R, Akutsu Y, Sakata H, Hanari N, Murakami K, Kano M, et al. ZNF750 Expression as a Novel Candidate Biomarker of Chemoradiosensitivity in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology*. 2017;93(3):197–203.
182. Otsuka R, Akutsu Y, Sakata H, Hanari N, Murakami K, Kano M, et al. ZNF750 Expression Is a Potential Prognostic Biomarker in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology*. 2018;94(3):142–8.
183. Yang H, Pan L, Xu C, Zhang Y, Li K, Chen S, et al. Overexpression of tumor suppressor gene ZNF750 inhibits oral squamous cell carcinoma metastasis. *Oncol Lett*. 2017 Nov;14(5):5591–6.
184. Gillison ML, Akagi K, Xiao W, Jiang B, Pickard RKL, Li J, et al. Human papillomavirus and the landscape of secondary genetic alterations in oral cancers.

Genome Res. 2019;29(1):1–17.

185. Pan L, Yang H, Xu C, Chen S, Meng Z, Li K, et al. ZNF750 inhibited the malignant progression of oral squamous cell carcinoma by regulating tumor vascular microenvironment. *Biomed Pharmacother*. 2018 Sep;105:566–72.

186. Froimchuk E, Jang Y, Ge K. Histone H3 lysine 4 methyltransferase KMT2D. *Gene*. 2017 Sep 5;627:337–42.

187. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):693–705.

188. Lee J, Kim D-H, Lee S, Yang Q-H, Lee DK, Lee S-K, et al. A tumor suppressive coactivator complex of p53 containing ASC-2 and histone H3-lysine-4 methyltransferase MLL3 or its paralogue MLL4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 May 26;106(21):8513–8.

189. Rampias T, Karagiannis D, Avgeris M, Polyzos A, Kokkalis A, Kanaki Z, et al. The lysine-specific methyltransferase KMT2C/MLL3 regulates DNA repair components in cancer. *EMBO Rep*. 2019 Mar;20(3).

190. Kantidakis T, Saponaro M, Mitter R, Horswell S, Kranz A, Boeing S, et al. Mutation of cancer driver MLL2 results in transcription stress and genome instability. *Genes Dev*. 2016 Feb 15;30(4):408–20.

191. Ford DJ, Dingwall AK. The cancer COMPASS: navigating the functions of MLL complexes in cancer. *Cancer Genet*. 2015 May;208(5):178–91.

192. Bennett RL, Swaroop A, Troche C, Licht JD. The Role of Nuclear Receptor-Binding SET Domain Family Histone Lysine Methyltransferases in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 Jun 1;7(6).

193. Bianco-Miotto T, Chiam K, Buchanan G, Jindal S, Day TK, Thomas M, et al. Global levels of specific histone modifications and an epigenetic gene signature predict prostate cancer progression and development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Oct;19(10):2611–22.

194. Ghasemi F, Prokopec SD, MacNeil D, Mundi N, Gameiro SF, Howlett C, et al. Mutational analysis of head and neck squamous cell carcinoma stratified by smoking status. *JCI Insight*. 2019 Jan 10;4(1).

195. Ybe JA. Novel clathrin activity: developments in health and disease. *Biomol Concepts*. 2014 May;5(2):175–82.

196. Bridge JA, Kanamori M, Ma Z, Pickering D, Hill DA, Lydiatt W, et al. Fusion of the ALK Gene to the Clathrin Heavy Chain Gene, CLTC, in Inflammatory Myofibroblastic Tumor. *Am J Pathol*. 2001 Aug;159(2):411–5.

197. Morris LGT, Kaufman AM, Gong Y, Ramaswami D, Walsh LA, Turcan Ş, et al. Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation. *Nat Genet*. 2013 Mar;45(3):253–61.

198. Lin S-C, Lin L-H, Yu S-Y, Kao S-Y, Chang K-W, Cheng H-W, et al. FAT1 somatic mutations in head and neck carcinoma are associated with tumor progression

and survival. *Carcinogenesis*. 2018 Dec 13;39(11):1320–30.

199. Huang J, Qian Z, Gong Y, Wang Y, Guan Y, Han Y, et al. Comprehensive genomic variation profiling of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer identifies potential targets for cervical cancer early warning. *J Med Genet*. 2019 Mar;56(3):186–94.

200. Martin D, Degese MS, Vitale-Cross L, Iglesias-Bartolome R, Valera JLC, Wang Z, et al. Assembly and activation of the Hippo signalome by FAT1 tumor suppressor. *Nat Commun*. 2018 09;9(1):2372.

201. Zhu B, Rippe C, Holmberg J, Zeng S, Perisic L, Albinsson S, et al. Nexilin/NEXN controls actin polymerization in smooth muscle and is regulated by myocardin family coactivators and YAP. *Sci Rep*. 2018 Aug 29;8(1):13025.

202. Sousa S, Cabanes D, Archambaud C, Colland F, Lemichez E, Popoff M, et al. ARHGAP10 is necessary for alpha-catenin recruitment at adherens junctions and for *Listeria* invasion. *Nat Cell Biol*. 2005 Oct;7(10):954–60.

203. Rosa LRO, Soares GM, Silveira LR, Boschero AC, Barbosa-Sampaio HCL. ARHGAP21 as a master regulator of multiple cellular processes. *J Cell Physiol*. 2018 Nov;233(11):8477–81.

204. Li B, Wang L, Li Z, Wang W, Zhi X, Huang X, et al. miR-3174 Contributes to Apoptosis and Autophagic Cell Death Defects in Gastric Cancer Cells by Targeting ARHGAP10. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Dec 15;9:294–311.

205. Teng J-P, Yang Z-Y, Zhu Y-M, Ni D, Zhu Z-J, Li X-Q. The roles of ARHGAP10 in the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells. *Oncol Lett*. 2017 Oct;14(4):4613–8.

206. Cartwright S, Karakesisoglou I. Nesprins in health and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2014 May;29:169–79.

207. Firat-Karalar EN, Rauniyar N, Yates JR, Stearns T. Proximity interactions among centrosome components identify regulators of centriole duplication. *Curr Biol*. 2014 Mar 17;24(6):664–70.

208. Márquez J, Kohli M, Arteta B, Chang S, Li W-B, Goldblatt M, et al. Identification of hepatic microvascular adhesion-related genes of human colon cancer cells using random homozygous gene perturbation. *Int J Cancer*. 2013 Nov;133(9):2113–22.

209. Chatterton JE, Hirsch D, Schwartz JJ, Bickel PE, Rosenberg RD, Lodish HF, et al. Expression cloning of LDLB, a gene essential for normal Golgi function and assembly of the ldlCp complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Feb 2;96(3):915–20.

210. Merhi A, De Mees C, Abdo R, Victoria Alberola J, Marini AM. Wnt/ β -Catenin Signaling Regulates the Expression of the Ammonium Permease Gene RHBG in Human Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0128683.

211. Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Peadamallu CS, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, et al. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*. 2014 Feb 20;506(7488):371–5.

212. Cancer Genome Atlas Research Network, Albert Einstein College of Medicine, Analytical Biological Services, Barretos Cancer Hospital, Baylor College of Medicine, Beckman Research Institute of City of Hope, et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*. 2017 16;543(7645):378–84.
213. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
214. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
215. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436–44.
216. Nakamura K, Smyth MJ. Targeting cancer-related inflammation in the era of immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2017;95(4):325–32.
217. Ghanem I, Riveiro ME, Paradis V, Faivre S, de Parga PMV, Raymond E. Insights on the CXCL12-CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma carcinogenesis. *Am J Transl Res*. 2014;6(4):340–52.
218. Adefuye A, Sales K. Regulation of inflammatory pathways in cancer and infectious disease of the cervix. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:548150.
219. Smola S. Immunopathogenesis of HPV-Associated Cancers and Prospects for Immunotherapy. *Viruses*. 2017 12;9(9).
220. Jacome AA, Eng C. Experimental and investigational drugs for the treatment of anal cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018;27(12):941–50.
221. Isambert N, Hervieu A, Rébé C, Hennequin A, Borg C, Zanetta S, et al. Fluorouracil and bevacizumab plus anakinra for patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard therapies (IRAFU): a single-arm phase 2 study. *Oncoimmunology*. 2018;7(9):e1474319.
222. Kampan NC, Xiang SD, McNally OM, Stephens AN, Quinn MA, Plebanski M. Immunotherapeutic Interleukin-6 or Interleukin-6 Receptor Blockade in Cancer: Challenges and Opportunities. *Curr Med Chem*. 2018;25(36):4785–806.
223. Grabosch SM, Shariff OM, Helm CW. Non-steroidal anti-inflammatory agents to induce regression and prevent the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 12;2:CD004121.
224. Mullerat J, Wong Te Fong LF, Davies SE, Winslet MC, Perrett CW. Angiogenesis in anal warts, anal intraepithelial neoplasia and anal squamous cell carcinoma. *Colorectal Dis*. 2003 Jul;5(4):353–7.
225. López-Ocejo O, Vilorio-Petit A, Bequet-Romero M, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel RS. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene*. 2000 Sep 21;19(40):4611–20.
226. Minion LE, Tewari KS. Cervical cancer - State of the science: From angiogenesis blockade to checkpoint inhibition. *Gynecol Oncol*. 2018;148(3):609–21.

227. Monk BJ, Sill MW, Burger RA, Gray HJ, Buckers TE, Roman LD. Phase II trial of bevacizumab in the treatment of persistent or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 1;27(7):1069–74.
228. Monk BJ, Mas Lopez L, Zarba JJ, Oaknin A, Tarpin C, Termrungruanglert W, et al. Phase II, open-label study of pazopanib or lapatinib monotherapy compared with pazopanib plus lapatinib combination therapy in patients with advanced and recurrent cervical cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 1;28(22):3562–9.
229. Tewari KS, Sill MW, Long HJ, Penson RT, Huang H, Ramondetta LM, et al. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N Engl J Med*. 2014 Feb 20;370(8):734–43.
230. Duchartre Y, Kim Y-M, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Mar;99:141–9.
231. Rampias T, Boutati E, Pectasides E, Sasaki C, Kountourakis P, Weinberger P, et al. Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Res*. 2010 Mar;8(3):433–43.
232. Yang M, Wang M, Li X, Xie Y, Xia X, Tian J, et al. Wnt signaling in cervical cancer? *J Cancer*. 2018 Mar 20;9(7):1277–86.
233. Garg MK, Zhao F, Sparano JA, Palefsky J, Whittington R, Mitchell EP, et al. Cetuximab Plus Chemoradiotherapy in Immunocompetent Patients With Anal Carcinoma: A Phase II Eastern Cooperative Oncology Group–American College of Radiology Imaging Network Cancer Research Group Trial (E3205). *J Clin Oncol*. 2017 Mar 1;35(7):718–26.
234. Feliu J, Garcia-Carbonero R, Capdevila J, Guasch I, Alonso V, López-López C, et al. Phase II study of panitumumab, 5-fluorouracil, mitomycin-c and radiotherapy treatment in patients with non-metastatic squamous cell carcinoma of the anal canal: safety and efficacy results (VITAL study)—GEMCAD 09-02. *JCO*. 2018 May 20;36(15_suppl):3566–3566.
235. Smith JP, Fonkouda LK, Moody TW. The Role of Gastrin and CCK Receptors in Pancreatic Cancer and other Malignancies. *Int J Biol Sci*. 2016;12(3):283–91.
236. Meulendijks D, Tomaso NB, Dewit L, Smits PHM, Bakker R, van Velthuisen M-LF, et al. HPV-negative squamous cell carcinoma of the anal canal is unresponsive to standard treatment and frequently carries disruptive mutations in TP53. *Br J Cancer*. 2015 Apr 14;112(8):1358–66.
237. Steenbergen RDM, Snijders PJF, Heideman DAM, Meijer CJLM. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat Rev Cancer*. 2014 Jun;14(6):395–405.
238. Sahasrabuddhe VV, Luhn P, Wentzensen N. Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. *Future Microbiol*. 2011 Sep;6(9):1083–98.
239. Han M-R, Shin S, Park H-C, Kim MS, Lee SH, Jung SH, et al. Mutational

- signatures and chromosome alteration profiles of squamous cell carcinomas of the vulva. *Exp Mol Med*. 2018 09;50(2):e442.
240. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 2017 Jun 15;66(6):801–17.
241. Jiao S, Li N, Cai S, Guo H, Wen Y. Inhibition of CYFIP2 promotes gastric cancer cell proliferation and chemoresistance to 5-fluorouracil through activation of the Akt signaling pathway. *Oncol Lett*. 2017 Apr;13(4):2133–40.
242. Luan J, Gao X, Hu F, Zhang Y, Gou X. SLFN11 is a general target for enhancing the sensitivity of cancer to chemotherapy (DNA-damaging agents). *J Drug Target*. 2019 May 16;1–28.
243. Bellacosa A. Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA repair and human cancer. *J Cell Physiol*. 2001 May;187(2):137–44.
244. Sur I, Neumann S, Noegel AA. Nesprin-1 role in DNA damage response. *Nucleus*. 2014 Apr;5(2):173–91.
245. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):235–46.
246. Ma T, Lu C, Guo Y, Zhang C, Du X. Human U3 protein 14a plays an anti-apoptotic role in cancer cells. *Biol Chem*. 2017 26;398(11):1247–57.
247. Hu L, Wang J, Liu Y, Zhang Y, Zhang L, Kong R, et al. A small ribosomal subunit (SSU) processome component, the human U3 protein 14A (hUTP14A) binds p53 and promotes p53 degradation. *J Biol Chem*. 2011 Jan 28;286(4):3119–28.
248. Randon G, Fucà G, Rossini D, Raimondi A, Pagani F, Perrone F, et al. Prognostic impact of ATM mutations in patients with metastatic colorectal cancer. *Sci Rep*. 2019 Feb 27;9(1):2858.
249. Yin M, Grivas P, Enamekhoo H, Mendiratta P, Ali S, Hsu J, et al. ATM/RB1 mutations predict shorter overall survival in urothelial cancer. *Oncotarget*. 2018 Mar 30;9(24):16891–8.
250. Siegel EM, Eschrich S, Winter K, Riggs B, Berglund A, Ajidahun A, et al. Epigenomic characterization of locally advanced anal cancer: a radiation therapy oncology group 98-11 specimen study. *Dis Colon Rectum*. 2014 Aug;57(8):941–57.
251. Palisoul ML, Mullen MM, Feldman R, Thaker PH. Identification of molecular targets in vulvar cancers. *Gynecol Oncol*. 2017;146(2):305–13.
252. Jacob JM, Ferry EK, Gay LM, Elvin JA, Vergilio J, Ramkissoon S, et al. Comparative Genomic Profiling of Refractory/Metastatic Penile and non-Penile Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Implications for Selection of Systemic Therapy. *J Urol*. 2018 Oct 3;
253. Ali SM, Pal SK, Wang K, Palma NA, Sanford E, Bailey M, et al. Comprehensive Genomic Profiling of Advanced Penile Carcinoma Suggests a High Frequency of Clinically Relevant Genomic Alterations. *Oncologist*. 2016 Jan;21(1):33–9.

254. Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. The Role of BRCA2 Mutation Status as Diagnostic, Predictive, and Prognosis Biomarker for Pancreatic Cancer. *Biomed Res Int* [Internet]. 2016 [cited 2019 May 10];2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5203890/>
255. Cui M, Gao X-S, Gu X, Guo W, Li X, Ma M, et al. BRCA2 mutations should be screened early and routinely as markers of poor prognosis: evidence from 8,988 patients with prostate cancer. *Oncotarget*. 2017 Mar 30;8(25):40222–32.
256. Xu K, Yang S, Zhao Y. Prognostic significance of BRCA mutations in ovarian cancer: an updated systematic review with meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Jan 3;8(1):285–302.
257. Zhu Y, Wu J, Zhang C, Sun S, Zhang J, Liu W, et al. BRCA mutations and survival in breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 Sep 21;7(43):70113–27.
258. Yue Y, Liu J, Cui X, Cao J, Luo G, Zhang Z, et al. VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discov*. 2018;4:10.
259. Zhu D, Zhou J, Zhao J, Jiang G, Zhang X, Zhang Y, et al. ZC3H13 suppresses colorectal cancer proliferation and invasion via inactivating Ras-ERK signaling. *J Cell Physiol*. 2019 Jun;234(6):8899–907.
260. Gnanapragasam VJ. Unlocking the molecular archive: the emerging use of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for biomarker research in urological cancer. *BJU Int*. 2010 Jan;105(2):274–8.
261. de Leng WWJ, Gadellaa-van Hooijdonk CG, Barendregt-Smouter FAS, Koudijs MJ, Nijman I, Hinrichs JWJ, et al. Targeted Next Generation Sequencing as a Reliable Diagnostic Assay for the Detection of Somatic Mutations in Tumours Using Minimal DNA Amounts from Formalin Fixed Paraffin Embedded Material. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0149405.
262. Jones S, Anagnostou V, Lytle K, Parpart-Li S, Nesselbush M, Riley DR, et al. Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation. *Sci Transl Med*. 2015 Apr 15;7(283):283ra53.
263. Mu W, Lu H-M, Chen J, Li S, Elliott AM. Sanger Confirmation Is Required to Achieve Optimal Sensitivity and Specificity in Next-Generation Sequencing Panel Testing. *J Mol Diagn*. 2016;18(6):923–32.
264. Beck TF, Mullikin JC, NISC Comparative Sequencing Program, Biesecker LG. Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants. *Clin Chem*. 2016 Apr;62(4):647–54.

ÍNDICE DE TABLAS

9 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores pronósticos clínicos negativos según los ensayos clínicos fase III de carcinoma de ano localizado	41
Tabla 2. Criterios de filtrado de variantes de alto impacto y de variantes frecuentes	76
Tabla 3. Características clínico-patológicas	85
Tabla 4. Distribución de genotipos de VPH en las muestras tumorales de pacientes	86
Tabla 5. Detalle de los tratamientos recibidos	86
Tabla 6. Factores pronósticos clínicos evaluados para supervivencia libre de enfermedad.....	88
Tabla 7. Genes portadores de variantes de alto impacto	93
Tabla 8. Número y frecuencia de genes recurrentemente afectados (≥ 2) por variantes de alto impacto.....	94
Tabla 9. Variantes de alto impacto sobre los genes alterados en 3 o más pacientes	94
Tabla 10. Tipo de variantes detectadas por el análisis de VarSeq™ y Alamut	95
Tabla 11. Genes afectados de variantes de alto impacto implicados en algunas de las vías patogénicas más frecuentes tras clasificación por PANTHER.....	100
Tabla 12. Variantes genéticas diferenciales (p no ajustada < 0,05) para la variable infección por VPH	102
Tabla 13. Frecuencia de variantes sobre TP53 en función de la presencia o ausencia de VPH	102
Tabla 14. Variantes genéticas diferenciales (p no ajustada < 0,05) para la variable infección por VIH.....	103
Tabla 15. Variantes genéticas diferenciales (p no ajustada < 0,05) para la variable dicotomizada estadio	103
Tabla 16. Variantes genéticas diferenciales (p no ajustada < 0,05) para la variable dicotomizada afectación ganglionar.....	104
Tabla 17. Estadísticos de los genes relacionados con SLE	107
Tabla 18. Genes con variantes asociados a peor supervivencia libre de enfermedad.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

10 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia ajustada por edad de carcinoma epidermoide de ano, por sexos	24
Figura 2. Anatomía de la región anal	26
Figura 3. Etiopatogenia del carcinoma epidermoide de ano VPH (+)	34
Figura 4. Proyectos y países participantes en el ICGC (126).....	50
Figura 5. Proceso de captura de fragmentos de ADN por hibridación	56
Figura 6. Esquema de la metodología empleada para el filtrado y posterior análisis de datos	75
Figura 7. Esquema representativo de los tipos de variantes según la localización de la región genómica de transcripción (166)	76
Figura 8. Diagrama de flujo de inclusión y análisis de pacientes	84
Figura 9. Curva de supervivencia libre de enfermedad (SLE).....	87
Figura 10. Curva de supervivencia global (SG).....	88
Figura 11. Supervivencia libre de enfermedad en función del sexo	89
Figura 12. Supervivencia libre de enfermedad en función de la edad.....	89
Figura 13. Supervivencia libre de enfermedad en función de la infección por VPH	90
Figura 14. Supervivencia libre de enfermedad en función del estadio TNM de la 6ª edición de la AJCC	90
Figura 15. Supervivencia libre de enfermedad en función de la afectación ganglionar	91
Figura 16. Mapa de las variantes genéticas de alto impacto en genes recurrentes (≥ 2) identificadas por VarSeq™ y Alamut.	95
Figura 17. Procesos biológicos afectados por los genes con variantes de alto impacto	96
Figura 18. Procesos biológicos afectados por los genes recurrentes con variantes de alto impacto	97
Figura 19. Vías de señalización a las que pertenecen las variantes genéticas de alto impacto (análisis en PANTHER).....	98
Figura 20. Vías de señalización con genes afectados por variantes de alto impacto según PANTHER	99
Figura 21. Vías de señalización con cuatro o más genes con variantes de alto impacto	100
Figura 22. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de la presencia o ausencia de variantes genéticas sobre BRCA2	105
Figura 23. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de la presencia o ausencia de variantes genéticas sobre ZNF750	105
Figura 24. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de la presencia o ausencia de variantes genéticas sobre FAM208B	106
Figura 25. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de la presencia o ausencia de variantes genéticas sobre ZC3H13	106
Figura 26. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de la presencia o ausencia de variantes genéticas sobre ZNF599	107
Figura 27. Sustratos de degradación de FBXW7. Imagen Modificada de Yeh CH et al (171)	114
Figura 28. Mutaciones de alto impacto en cáncer de cérvix de acuerdo con el ICGC Data Portal (126)	121
Figura 29. Hallmarks del cáncer originalmente propuestas en el año 2000 ..	123

Figura 30. Hallmarks emergentes del cáncer propuestos en 2011.	124
Figura 31. Vía de señalización canónica de Wnt. En ausencia de Wnt, β - catenina es degradada por el proteasoma en el citoplasma. En presencia de Wnt, β -catenina no se degrada, traslocándose al núcleo y permitiendo la transcripción de genes diana de Wnt	129

ANEXOS

11 ANEXOS

Anexo 1. Número y frecuencia de genes que presentan variantes tras filtrado

Gen	Número de variantes	Frecuencia de variantes
<i>TTN</i>	30	67%
<i>BCLAF1</i>	29	64%
<i>CS</i>	21	47%
<i>PIK3CA</i>	18	40%
<i>FBXW10</i>	17	38%
<i>MUC4</i>	17	38%
<i>MAGI1</i>	15	33%
<i>MUC16</i>	15	33%
<i>VTN</i>	15	33%
<i>CTB-96E2.2</i>	14	31%
<i>IFT122</i>	14	31%
<i>LSMD1</i>	14	31%
<i>MUC17</i>	14	31%
<i>KMT2D</i>	13	29%
<i>PCLO</i>	13	29%
<i>ATM</i>	12	27%
<i>SPEN</i>	12	27%
<i>NCOR2</i>	12	27%
<i>HUWE1</i>	11	24%
<i>MACF1</i>	11	24%
<i>NEB</i>	11	24%
<i>OBSCN</i>	11	24%
<i>USH2A</i>	11	24%

<i>ADCK2</i>	11	24%
<i>AHNAK</i>	10	22%
<i>CSMD1</i>	10	22%
<i>DST</i>	10	22%
<i>KMT2C</i>	10	22%
<i>MED12L</i>	10	22%
<i>SRRM2</i>	10	22%
<i>C5orf42</i>	9	20%
<i>DNAH17</i>	9	20%
<i>FREM2</i>	9	20%
<i>HCFC1</i>	9	20%
<i>LRP2</i>	9	20%
<i>MSN</i>	9	20%
<i>MUC5B</i>	9	20%
<i>PKHD1</i>	9	20%
<i>RBPJ</i>	9	20%
<i>SYNE2</i>	9	20%
<i>TCHH</i>	9	20%
<i>VCAN</i>	9	20%
<i>KAT6B</i>	9	20%
<i>MYCBP2</i>	9	20%
<i>ZAN</i>	9	20%
<i>CNTNAP2</i>	9	20%
<i>AC104809.3</i>	8	18%
<i>BPTF</i>	8	18%
<i>BRCA1</i>	8	18%
<i>BRCA2</i>	8	18%
<i>BSN</i>	8	18%

<i>CAMSAP1</i>	8	18%
<i>CSMD3</i>	8	18%
<i>DMD</i>	8	18%
<i>DNAH14</i>	8	18%
<i>FAT1</i>	8	18%
<i>FAT2</i>	8	18%
<i>HSPG2</i>	8	18%
<i>LAMA5</i>	8	18%
<i>MAST2</i>	8	18%
<i>MBD5</i>	8	18%
<i>NSD1</i>	8	18%
<i>PRRC2C</i>	8	18%
<i>PTPRO</i>	8	18%
<i>UBR4</i>	8	18%
<i>ZNF462</i>	8	18%
<i>ZSWIM8</i>	8	18%
<i>AHNAK2</i>	8	18%
<i>CDCP2</i>	8	18%
<i>ENAH</i>	8	18%
<i>FLG</i>	8	18%
<i>LRP1B</i>	8	18%
<i>MAP2</i>	8	18%
<i>RYR2</i>	8	18%
<i>TPTE</i>	8	18%
<i>TEX15</i>	8	18%
<i>DNAH9</i>	8	18%
<i>C2orf16</i>	8	18%
<i>AK9</i>	7	16%

<i>BIRC6</i>	7	16%
<i>CCDC180</i>	7	16%
<i>CHD7</i>	7	16%
<i>CMYA5</i>	7	16%
<i>COL11A1</i>	7	16%
<i>DGKZ</i>	7	16%
<i>DNAH1</i>	7	16%
<i>DNHD1</i>	7	16%
<i>DYNC2H1</i>	7	16%
<i>EIF4G3</i>	7	16%
<i>FAM208B</i>	7	16%
<i>FAT4</i>	7	16%
<i>GCN1L1</i>	7	16%
<i>GPR98</i>	7	16%
<i>INO80</i>	7	16%
<i>KIAA0100</i>	7	16%
<i>LAMA1</i>	7	16%
<i>MED1</i>	7	16%
<i>MYO15A</i>	7	16%
<i>PCNT</i>	7	16%
<i>PCNXL3</i>	7	16%
<i>PRR12</i>	7	16%
<i>RANBP2</i>	7	16%
<i>RNF40</i>	7	16%
<i>SMG1</i>	7	16%
<i>UBR5</i>	7	16%
<i>VPS13B</i>	7	16%
<i>VWF</i>	7	16%

<i>ALMS1</i>	7	16%
<i>ATXN2L</i>	7	16%
<i>CELSR3</i>	7	16%
<i>COL7A1</i>	7	16%
<i>DMBT1</i>	7	16%
<i>DOCK3</i>	7	16%
<i>HERC1</i>	7	16%
<i>HMCN1</i>	7	16%
<i>IGSF10</i>	7	16%
<i>KIAA0753</i>	7	16%
<i>KRTAP5-10</i>	7	16%
<i>MASP1</i>	7	16%
<i>MYO6</i>	7	16%
<i>NCOA2</i>	7	16%
<i>NEFH</i>	7	16%
<i>QSER1</i>	7	16%
<i>SYNE1</i>	7	16%
<i>VPS13D</i>	7	16%
<i>ZFHX3</i>	7	16%
<i>PTPN13</i>	7	16%
<i>FBXW7</i>	7	16%
<i>HELZ2</i>	7	16%
<i>ANPEP</i>	6	13%
<i>CACNA1F</i>	6	13%
<i>CCDC108</i>	6	13%
<i>CDH23</i>	6	13%
<i>COL6A6</i>	6	13%
<i>CROCC</i>	6	13%

<i>CYFIP2</i>	6	13%
<i>DNAH2</i>	6	13%
<i>DNAH6</i>	6	13%
<i>GRID2IP</i>	6	13%
<i>KDM6B</i>	6	13%
<i>KIAA1109</i>	6	13%
<i>KIAA1211</i>	6	13%
<i>MAPK8IP3</i>	6	13%
<i>MAPKAPK2</i>	6	13%
<i>NARS</i>	6	13%
<i>PAPPA2</i>	6	13%
<i>PDE4DIP</i>	6	13%
<i>PHACTR4</i>	6	13%
<i>PHLPP2</i>	6	13%
<i>PLEC</i>	6	13%
<i>RGAG1</i>	6	13%
<i>RNF213</i>	6	13%
<i>RYR3</i>	6	13%
<i>SDK1</i>	6	13%
<i>SRRM1</i>	6	13%
<i>TAF15</i>	6	13%
<i>TATDN1</i>	6	13%
<i>THOC2</i>	6	13%
<i>TRIO</i>	6	13%
<i>VWA3A</i>	6	13%
<i>WDFY3</i>	6	13%
<i>ZC3H13</i>	6	13%
<i>ZCCHC6</i>	6	13%

<i>ZNF599</i>	6	13%
<i>ABCA13</i>	6	13%
<i>ANKHD1</i>	6	13%
<i>ANKRD27</i>	6	13%
<i>CHD1</i>	6	13%
<i>CUBN</i>	6	13%
<i>DNAH7</i>	6	13%
<i>DOCK10</i>	6	13%
<i>DOCK7</i>	6	13%
<i>FAM186A</i>	6	13%
<i>FN1</i>	6	13%
<i>GOLGB1</i>	6	13%
<i>HRNR</i>	6	13%
<i>KIAA1244</i>	6	13%
<i>KMT2B</i>	6	13%
<i>MICAL3</i>	6	13%
<i>MXRA5</i>	6	13%
<i>MYBBP1A</i>	6	13%
<i>MYH11</i>	6	13%
<i>NOTCH2</i>	6	13%
<i>POU2F1</i>	6	13%
<i>QRICH2</i>	6	13%
<i>SBNO2</i>	6	13%
<i>SI</i>	6	13%
<i>SPTA1</i>	6	13%
<i>SRRT</i>	6	13%
<i>TNRC18</i>	6	13%
<i>TRAF3IP1</i>	6	13%

<i>TRANK1</i>	6	13%
<i>ZFHX4</i>	6	13%
<i>ADAM19</i>	6	13%
<i>CFP</i>	6	13%
<i>COL18A1</i>	6	13%
<i>FTSJ3</i>	6	13%
<i>NRK</i>	6	13%
<i>TLN2</i>	6	13%
<i>TSPAN6</i>	6	13%
<i>UTP14A</i>	6	13%
<i>ZZEF1</i>	6	13%
<i>ANK3</i>	6	13%
<i>LYST</i>	6	13%
<i>RAB40AL</i>	6	13%
<i>TBC1D8B</i>	6	13%
<i>WSCD2</i>	6	13%
<i>ZFAT</i>	6	13%
<i>BOD1L1</i>	6	13%
<i>NOTCH1</i>	6	13%
<i>PDZD2</i>	6	13%
<i>SLFN11</i>	6	13%
<i>ZNF469</i>	6	13%
<i>CSPG4</i>	6	13%
<i>ASCL1</i>	6	13%
<i>AKAP9</i>	5	11%
<i>AQR</i>	5	11%
<i>ARID1B</i>	5	11%
<i>BZRAP1</i>	5	11%

<i>C10orf71</i>	5	11%
<i>C3</i>	5	11%
<i>CAD</i>	5	11%
<i>CDHR5</i>	5	11%
<i>CEP164</i>	5	11%
<i>CHD5</i>	5	11%
<i>CHD8</i>	5	11%
<i>CHRM3</i>	5	11%
<i>COL5A3</i>	5	11%
<i>CR1</i>	5	11%
<i>DCHS2</i>	5	11%
<i>DIP2B</i>	5	11%
<i>DNAH11</i>	5	11%
<i>DNAH12</i>	5	11%
<i>DYNC1H1</i>	5	11%
<i>EFCAB6</i>	5	11%
<i>FANCM</i>	5	11%
<i>FAT3</i>	5	11%
<i>FBXO38</i>	5	11%
<i>GARNL3</i>	5	11%
<i>GATAD2A</i>	5	11%
<i>GNPAT</i>	5	11%
<i>HEATR5B</i>	5	11%
<i>IPO11</i>	5	11%
<i>IQGAP2</i>	5	11%
<i>KDM2A</i>	5	11%
<i>KIF13A</i>	5	11%
<i>KIF24</i>	5	11%

<i>MED13L</i>	5	11%
<i>MGAM</i>	5	11%
<i>MIB2</i>	5	11%
<i>MTOR</i>	5	11%
<i>MYH15</i>	5	11%
<i>MYO5B</i>	5	11%
<i>MYO9B</i>	5	11%
<i>NIPBL</i>	5	11%
<i>NUP160</i>	5	11%
<i>OBSL1</i>	5	11%
<i>OTOG</i>	5	11%
<i>PCDHA11</i>	5	11%
<i>PCDHA3</i>	5	11%
<i>PIK3C2B</i>	5	11%
<i>POLQ</i>	5	11%
<i>PPRC1</i>	5	11%
<i>PRKDC</i>	5	11%
<i>PTPRF</i>	5	11%
<i>RAD54L2</i>	5	11%
<i>RARG</i>	5	11%
<i>RGPD3</i>	5	11%
<i>RNF17</i>	5	11%
<i>RP11-407N17.3</i>	5	11%
<i>RP11-574K11.31</i>	5	11%
<i>RPTN</i>	5	11%
<i>RTEL1</i>	5	11%
<i>RYR1</i>	5	11%

<i>SHANK1</i>	5	11%
<i>SMARCA2</i>	5	11%
<i>SNRNP200</i>	5	11%
<i>TMEM131</i>	5	11%
<i>TRRAP</i>	5	11%
<i>USP31</i>	5	11%
<i>USP9Y</i>	5	11%
<i>VPS13A</i>	5	11%
<i>WDFY4</i>	5	11%
<i>XDH</i>	5	11%
<i>ZNF646</i>	5	11%
<i>ZNF750</i>	5	11%
<i>ACSL5</i>	5	11%
<i>ADAR</i>	5	11%
<i>AIM2</i>	5	11%
<i>AKAP1</i>	5	11%
<i>ANKHD1- EIF4EBP3</i>	5	11%
<i>ARID1A</i>	5	11%
<i>ARID4B</i>	5	11%
<i>ATP2B4</i>	5	11%
<i>ATRNL1</i>	5	11%
<i>CACNA1C</i>	5	11%
<i>CCNB3</i>	5	11%
<i>CDC42BPB</i>	5	11%
<i>CDK12</i>	5	11%
<i>CEP350</i>	5	11%
<i>CIITA</i>	5	11%
<i>COL1A2</i>	5	11%

<i>CSMD2</i>	5	11%
<i>DCC</i>	5	11%
<i>DLG5</i>	5	11%
<i>DNAH5</i>	5	11%
<i>EP400</i>	5	11%
<i>FAN1</i>	5	11%
<i>FLG2</i>	5	11%
<i>GCC2</i>	5	11%
<i>HIVEP1</i>	5	11%
<i>HYDIN</i>	5	11%
<i>IGSF9B</i>	5	11%
<i>KALRN</i>	5	11%
<i>KCNT2</i>	5	11%
<i>KIAA0947</i>	5	11%
<i>KIAA1429</i>	5	11%
<i>KIAA1522</i>	5	11%
<i>KMT2A</i>	5	11%
<i>LPIN3</i>	5	11%
<i>LRP1</i>	5	11%
<i>MAGEC1</i>	5	11%
<i>MAP9</i>	5	11%
<i>NEXN</i>	5	11%
<i>NOTCH3</i>	5	11%
<i>PCNXL2</i>	5	11%
<i>PDE6B</i>	5	11%
<i>PDS5B</i>	5	11%
<i>PLD1</i>	5	11%
<i>POU5F1B</i>	5	11%

<i>PRG4</i>	5	11%
<i>PTPN23</i>	5	11%
<i>RBM20</i>	5	11%
<i>RBM27</i>	5	11%
<i>RELN</i>	5	11%
<i>RPAP1</i>	5	11%
<i>RTEL1-TNFRSF6B</i>	5	11%
<i>SACS</i>	5	11%
<i>SBF1</i>	5	11%
<i>SH3BP1</i>	5	11%
<i>SLC8A3</i>	5	11%
<i>SNPH</i>	5	11%
<i>SVEP1</i>	5	11%
<i>TRAPPC10</i>	5	11%
<i>VPS13C</i>	5	11%
<i>ZDBF2</i>	5	11%
<i>ZFAND4</i>	5	11%
<i>ZMYM3</i>	5	11%
<i>ADAMTS9</i>	5	11%
<i>ANKRD18B</i>	5	11%
<i>AP3B1</i>	5	11%
<i>BAI2</i>	5	11%
<i>BCAN</i>	5	11%
<i>CEP250</i>	5	11%
<i>CIT</i>	5	11%
<i>CNTLN</i>	5	11%
<i>HIPK3</i>	5	11%
<i>KTN1</i>	5	11%

<i>MAP4K4</i>	5	11%
<i>NES</i>	5	11%
<i>NOP9</i>	5	11%
<i>TACC2</i>	5	11%
<i>UTRN</i>	5	11%
<i>ABCC12</i>	5	11%
<i>ARID2</i>	5	11%
<i>CCDC88B</i>	5	11%
<i>CENPJ</i>	5	11%
<i>EPG5</i>	5	11%
<i>LIG1</i>	5	11%
<i>MAP1A</i>	5	11%
<i>PKD1</i>	5	11%
<i>SYBU</i>	5	11%
<i>TNRC6B</i>	5	11%
<i>ZMYM6</i>	5	11%
<i>ZNF292</i>	5	11%
<i>ZNFX1</i>	5	11%
<i>ARHGAP35</i>	5	11%
<i>ARHGEF40</i>	5	11%
<i>BCORL1</i>	5	11%
<i>SPEG</i>	5	11%
<i>ZC3H11A</i>	5	11%
<i>ZC3H12B</i>	5	11%

ABREVIATURAS

12 ABREVIATURAS

5-FU: 5-Fluorouracilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AIN: *Anal intraepithelial neoplasia* (Neoplasia intraepitelial de ano)

AINES: Anti-inflamatorios no esteroideos

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

CCKR: *Cholecystokinin receptors* (Receptores de la colecistoquinina)

ctADN: Ácido desoxirribonucleico tumoral circulantes

CTLA-4: *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen*

DSC1: Desmocolina-1

DSG1: Desmogleina-1

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

EGFR: *Epidermal growth factor receptor* (Factor de crecimiento epidérmico)

FFPE: *formalin-fixed, paraffin embedded* (fijada en formol y embebida en parafina)

HR: *Hazard ratio* (cociente de riesgo)

HSH: Hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres

HSIL: *High-grade squamous intraepithelial lesion* (lesión escamosa intraepitelial de alto grado)

HSM: Hombres que mantienen relaciones sexuales con mujeres

ICGC: *International Cancer Genome Consortium*

IGV: *Integrative Genomics Viewer*

LSIL: *Low-grade squamous intraepithelial lesion* (lesión escamosa intraepitelial de bajo grado)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PD1: *programmed death 1* (muerte programada 1)

PDGF: *Platelets derived growing factor* (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)

PET: Tomografía por emisión de positrones

QT: Quimioterapia

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RT: Radioterapia

SCCA: *Squamous cell carcinoma antigen* (antígeno del carcinoma de células escamosas)

SG: Supervivencia global

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SLC: Supervivencia libre de colostomía

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

SLP: Supervivencia libre de progresión

VEP: *Variant Effect Predictor*

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VPH: Virus del papiloma humano